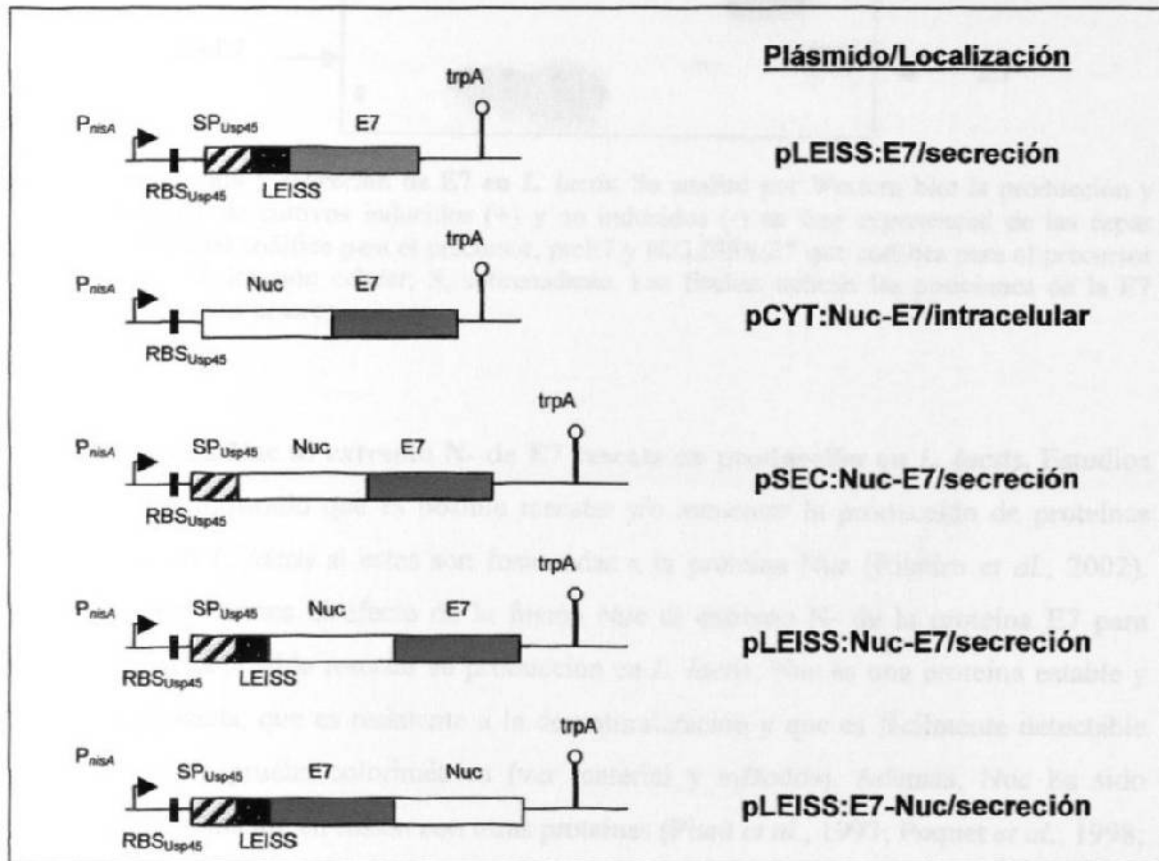


con anti-Nuc (dilución 1:250, gentilmente donado por Miller ó 1:250 para anti-E7) fueron llevados a cabo tal y como se describió en el capítulo anterior.

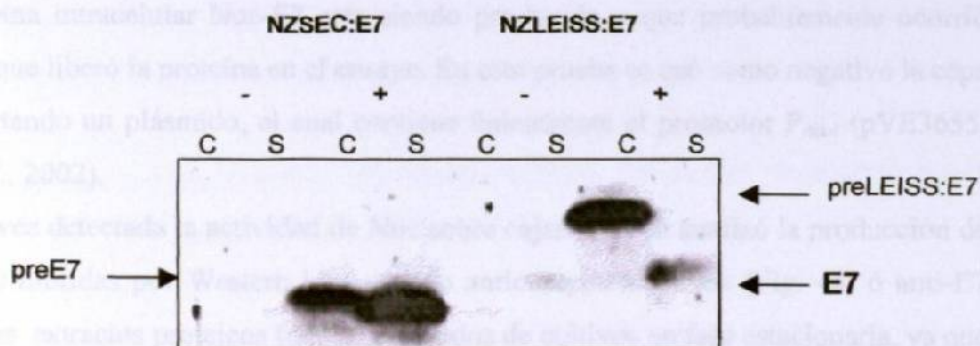
3.4 RESULTADOS

**3.4.1 El propéptido sintético LEISSTCDA no mejora la ES de la proteína E7 nativa en *L. lactis*.** En el capítulo anterior observamos que la proteína E7 del VPH-16 puede ser producida y secretada eficientemente en *L. lactis*; sin embargo, aunque la ES fue muy alta (~95%) no fue total. En este capítulo nos enfocamos en modificar las cargas en el extremo N- de la proteína E7 para ver si se puede alcanzar un 100% en la ES. Para este propósito se construyó el vector pLEISS:E7 (Fig. 1), donde el gene *E7* esta fusionado en marco de lectura (ORF) con un fragmento de ADN que contiene el RBS y el SP de la *usp45* (capítulo 2), más un propéptido sintético, LEISSTCDA (LEISS) el cual ha demostrado en trabajos



**Fig. 1. Cassettes de expresión para la producción de E7 en *L. lactis*.** Diseños esquemáticos de las fusiones génicas de E7 bajo el control del promotor  $P_{nisA}$  colocadas en los plásmidos indicados. Símbolos:  $\blacktriangleright$ , promotor lactococal inducible por nisina ( $P_{nisA}$ );  $\blacksquare$ , sitio de unión al ribosoma del gene *usp45*;  $\blacksquare$ , región codificante para E7;  $\square$  con diagonal, péptido señal del gene *usp45*;  $\square$ , región codificante para NucB;  $\blacksquare$ , región codificante para LEISS;  $\Uparrow$ , terminador transcripcional.

previos aumentar la ES de proteínas heterólogas en *L. lactis* (Le Loir *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999; Ribeiro *et al.*, 2002). Para comparar la ES de la proteína E7 entre la cepa NZSEC:E7 y la NZLEISS:E7, se obtuvieron muestras proteicas de cultivos inducidos con 10 ng/mL (ver más adelante) de nisina y se analizaron por Western blot revelando con anti-E7 (Fig. 2). Los resultados obtenidos muestran que la ES de la proteína E7 más el péptido sintético al contrario de lo que se esperaba es drásticamente reducida (~95% a tan solo un ~5%, Fig. 2).

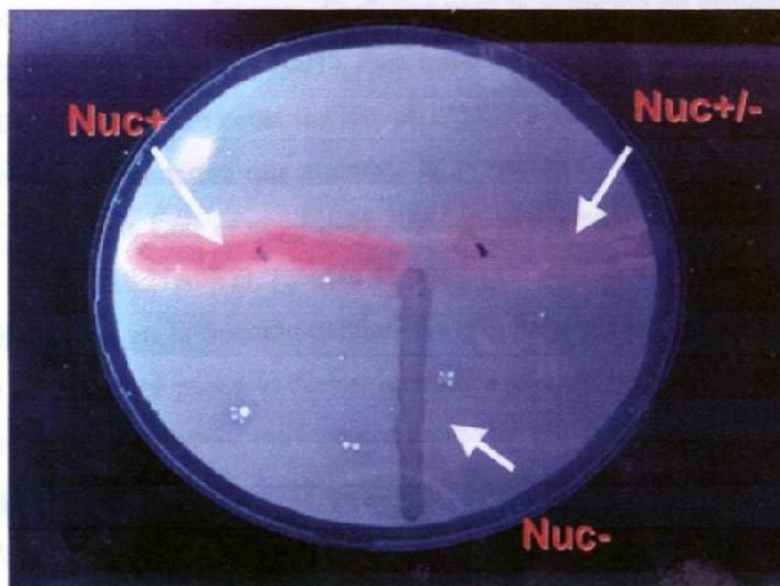


**Fig. 2. Producción y secreción de E7 en *L. lactis*.** Se analizó por Western blot la producción y secreción de E7 de cultivos inducidos (+) y no inducidos (-) en fase exponencial de las cepas NZSEC:E7 la cual codifica para el precursor, preE7 y NZLEISS:E7 que codifica para el precursor preLEISS:E7. C, fracción celular; S, sobrenadante. Las flechas indican las posiciones de la E7 madura y de los precursores.

**3.4.2 La fusión Nuc al extremo N- de E7 rescata su producción en *L. lactis*.** Estudios recientes han mostrado que es posible rescatar y/o aumentar la producción de proteínas heterólogas en *L. lactis* si estas son fusionadas a la proteína Nuc (Ribeiro *et al.*, 2002). Nosotros examinamos el efecto de la fusión Nuc al extremo N- de la proteína E7 para determinar si es posible rescatar su producción en *L. lactis*. Nuc es una proteína estable y bien caracterizada, que es resistente a la desnaturalización y que es fácilmente detectable por una simple prueba colorimétrica (ver material y métodos). Además, Nuc ha sido utilizada exitosamente en fusión con otras proteínas (Piard *et al.*, 1997; Poquet *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999). Así, para analizar el efecto de la fusión de Nuc a E7, se construyeron los plásmidos pCYT:Nuc-E7 y pSEC:Nuc-E7. Ambos plásmidos fueron establecidos en la cepa NZ9000 de *L. lactis* y la producción de la proteína fue analizada por medio de la prueba de la nucleasa (ver material y métodos). El azul de toluidina es un

colorante metacromático que presenta mayor afinidad por el ADN que por el agar presentando un color azul intenso cuando esta asociado al primero (Michaelis & Granick, 1945). Así pues, la hidrólisis del ADN por una actividad nucleolítica provoca que el complejo ADN-Toluidina se libere cambiando de azul intenso a un color rosa. Cultivos inducidos de la cepa NZSEC:Nuc-E7 presentaron un claro fenotipo Nuc+ (Fig. 3), tal y como se esperaba si la proteína híbrida Nuc-E7 esta siendo secretada. La cepa NZCYT:Nuc-E7 presentó un ligero desarrollo de color rosa (Nuc+/-, Fig. 3), sugiriendo que la proteína intracelular Nuc-E7 esta siendo producida y que probablemente ocurrió alguna lisis que liberó la proteína en el ensayo. En esta prueba se usó como negativo la cepa NZ9000 portando un plásmido, el cual contiene únicamente el promotor  $P_{nisA}$  (pVE3655, Ribeiro et al., 2002).

Una vez detectada la actividad de Nuc sobre cajas Petri se analizó la producción de las proteínas híbridas por Western blot usando anticuerpos anti-Nuc (Fig. 4a) ó anti-E7 (Fig. 4b). Los extractos proteicos fueron obtenidos de cultivos en fase estacionaria, ya que



**Fig. 3. Actividad de la nucleasa en clones de *L. lactis* expresando la proteína híbrida Nuc-E7.** Análisis de la actividad enzimática de la nucleasa en caja Petri demuestran que la forma de secreción de la proteína Nuc-E7 da una clara señal (halo rosa, Nuc+). La forma de citoplasma Nuc-E7 da una débil señal (Nuc+/-) debido quizá a lisis de algunas colonias al momento del ensayo. Como negativo se usó una cepa de *L. lactis* transformada con un plásmido que contiene únicamente el promotor  $P_{nisA}$  con la cual no se observa señal (Nuc-).

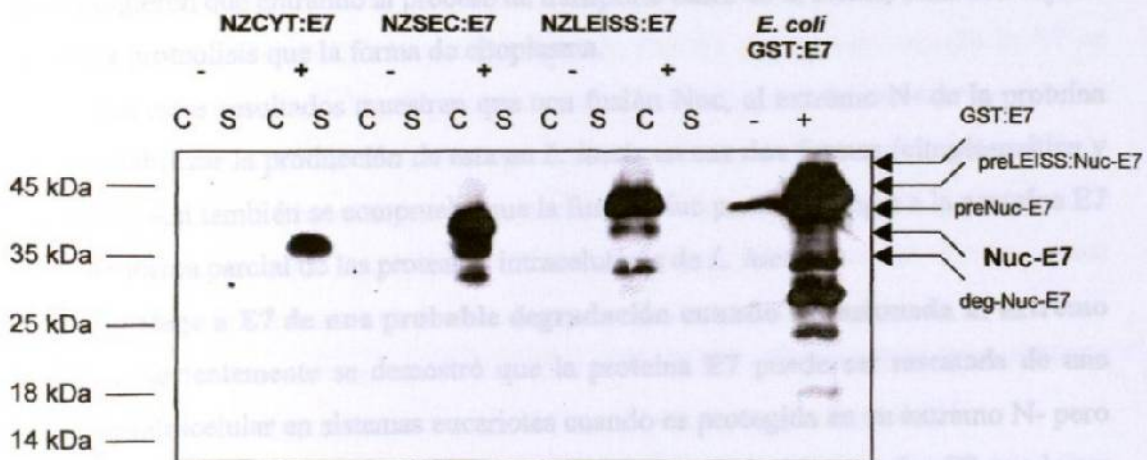
en ésta es donde se observa degradación de la E7 nativa en citoplasma (capítulo anterior).

Análisis por Western blot con anti-Nuc de la cepa NZCYT:Nuc-E7 después de la inducción, revela dos bandas en la fracción celular y ninguna señal en el sobrenadante (Fig. 4a). La banda superior migra de acuerdo a lo esperado para la fusión Nuc-E7 (40 kDa aproximadamente). La otra banda corresponde probablemente a un polipéptido resultante de una degradación intracelular de la proteína híbrida. Inmunodetección de extractos proteicos de la cepa NZSEC:Nuc-E7 revelan tres bandas en la fracción celular (Fig. 4a). La banda mayor corresponde al precursor SP<sub>usp</sub>:Nuc-E7, las otras dos migran a la misma altura que las formas intracelulares observadas en la cepa NZCYT:Nuc-E7 y que corresponden a la forma madura Nuc-E7 y al producto de proteólisis. En la inmunodetección del sobrenadante de esta cepa se observan dos bandas mayores, las cuales corresponden a la forma madura Nuc-E7 secretada y la otra al producto de la degradación observado en citoplasma; así también, se detectan polipéptidos de tamaños más pequeños, los cuales pueden ser productos de proteólisis de la proteína Nuc-E7 en el sobrenadante (Fig. 4a). No obstante, en este caso a diferencia de la proteína E7 nativa la ES es baja (~5%) lo cual se ha observado frecuentemente en sistemas diseñados para la secreción de proteínas heterólogas (Bolhuis *et al.*, 1999; Dieye *et al.*, 2001). Para tratar de aumentar ES de la proteína híbrida Nuc-E7 decidimos probar otra construcción, pLEISS:Nuc-E7 (Fig. 1) en la cual al SP se le fusionó un propéptido sintético que aumenta la secreción de proteínas heterólogas en *L. lactis*, LEISSTCDA (Le Loir *et al.*, 1998). Análisis por Western blot de la cepa con esta construcción (NZLEISS:Nuc-E7), revelan al igual que para la cepa NZSEC:Nuc-E7, tres bandas principalmente en la fracción celular. En este caso la banda mayor migra más alto debido a que el precursor posee la fusión *leiss*, SP<sub>usp</sub>:Leiss:Nuc-E7; las otras dos bandas corresponden a la forma Nuc-E7 madura y al producto de degradación. Adicionalmente, se observan un gran número de bandas pequeñas resultado de degradaciones secundarias (Fig. 4a). En el sobrenadante, tal y como se esperaba observamos de manera repetible una mayor ES de la proteína Nuc-E7 (~15%), aunque también aumenta el porcentaje de degradación. Curiosamente, los extractos de proteínas de las tres cepas sin inducir, revelan ligeras señales de producción de las proteínas híbridas (Fig. 4a). Esto puede ser debido a una actividad basal del P<sub>nz1</sub>.

(a) anti-Nuc



(b) anti-E7



**Fig. 4. La producción de Nuc-E7 es estable en *L. lactis*.** Se analizó la producción de Nuc-E7 por Western blot con anticuerpos anti-Nuc (a) ó anti-E7 (b). Los cultivos de las cepas: NZCYT:Nuc-E7 (codifica para Nuc-E7); NZSEC:Nuc-E7 (codifica para preNuc-E7) y NZLEISS:Nuc-E7 (codifica para preLEISS:Nuc-E7) fueron procesados en fase estacionaria Como negativo se usó una cepa que porta únicamente el plásmido con el promotor  $P_{nucA}$  (Neg.); y como positivo se usó una proteína purificada Nuc (SIGMA) para la inmunodetección con anti-Nuc y una proteína de fusión GST:E7 (*E. coli* GST:E7) inducible con IPTG (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside) para la inmunodetección con anti-E7. Cultivos no-inducidos (-) e inducidos (+) de las cepas indicadas. Las flechas indican las posiciones de las formas preLEISS:Nuc-E7, preNuc-E7, y Nuc-E7, así como también el producto de degradación (deg-Nuc:E7) y los controles, Nuc y GST:E7. C, fracción celular; S, sobrenadante; Las posiciones y tamaños del marcador de peso molecular son mostrados a la izquierda.

Como control negativo de los cultivos inducidos se usó nuevamente la cepa NZ9000(pVE3655) en la cual no se observa ninguna señal. Como control positivo se usó una proteína Nuc purificada (SIGMA) (Fig. 4a). Finalmente se realizó una inmunodetección usando un anticuerpo anti-E7 sobre el mismo Western blot (previa deshibridación) de la figura 4a (Fig. 4b). El perfil de proteínas detectados es similar al observado con el anticuerpo anti-Nuc, la única diferencia observada es que las pequeñas bandas producto de la degradación no son detectadas o son detectadas en menor cantidad con este anticuerpo, sugiriendo que la degradación ocurre en la parte E7. Aquí se usó como control una proteína de fusión GST:E7 obtenida a partir de una cepa de *E. coli*. Sin embargo, a pesar de que las tres construcciones, pCYT:Nuc-E7, pSEC:Nuc-E7, pLEISS:Nuc-E7 tienen el mismo diseño, la cantidad de proteína Nuc-E7 detectada en la cepa NZSEC:Nuc-E7 y NZLEISS:Nuc-E7 es significativamente más alta (dos a tres veces, respectivamente) que la de la cepa NZCYT:Nuc-E7. Los altos niveles de las proteínas de secreción sugieren que entrando al proceso de transporte fuera de la célula, éstas son sujetas a una menor proteólisis que la forma de citoplasma.

Todos estos resultados muestran que una fusión Nuc, al extremo N- de la proteína E7 puede estabilizar la producción de esta en *L. lactis* en sus dos formas (citoplasmática y de secreción). Así también se comprueba que la fusión Nuc puede proteger a la proteína E7 al menos de forma parcial de las proteasas intracelulares de *L. lactis*.

**3.4.3 Nuc protege a E7 de una probable degradación cuando es fusionada al extremo N- ó al C-.** Recientemente se demostró que la proteína E7 puede ser rescatada de una degradación intracelular en sistemas eucariotes cuando es protegida en su extremo N- pero no el C- (Reinstein *et al.*, 2000). En este contexto, para probar si la proteína E7 puede ser rescatada de la degradación intracelular en *L. lactis* cuando es fusionada a Nuc por su extremo C-, nos enfocamos en la forma de secreción LEISS:Nuc-E7. Para dicho propósito se construyó un plásmido adicional, pLEISS:E7-Nuc y se estableció en la cepa NZ9000 para generar, NZLEISS:E7-Nuc. La producción de esta construcción se comparó con la de la cepa NZLEISS:Nuc-E7 por Western blot con anticuerpos anti-Nuc y anti-E7 (Fig. 5). En la inmunodetección con el anticuerpo anti-Nuc (Fig. 5a) de la fracción celular de la cepa NZLEISS:Nuc-E7 se puede observar una banda mayor que corresponde a la esperada para el precursor LEISS:Nuc-E7 (pre). También se detectan varias bandas de menor peso

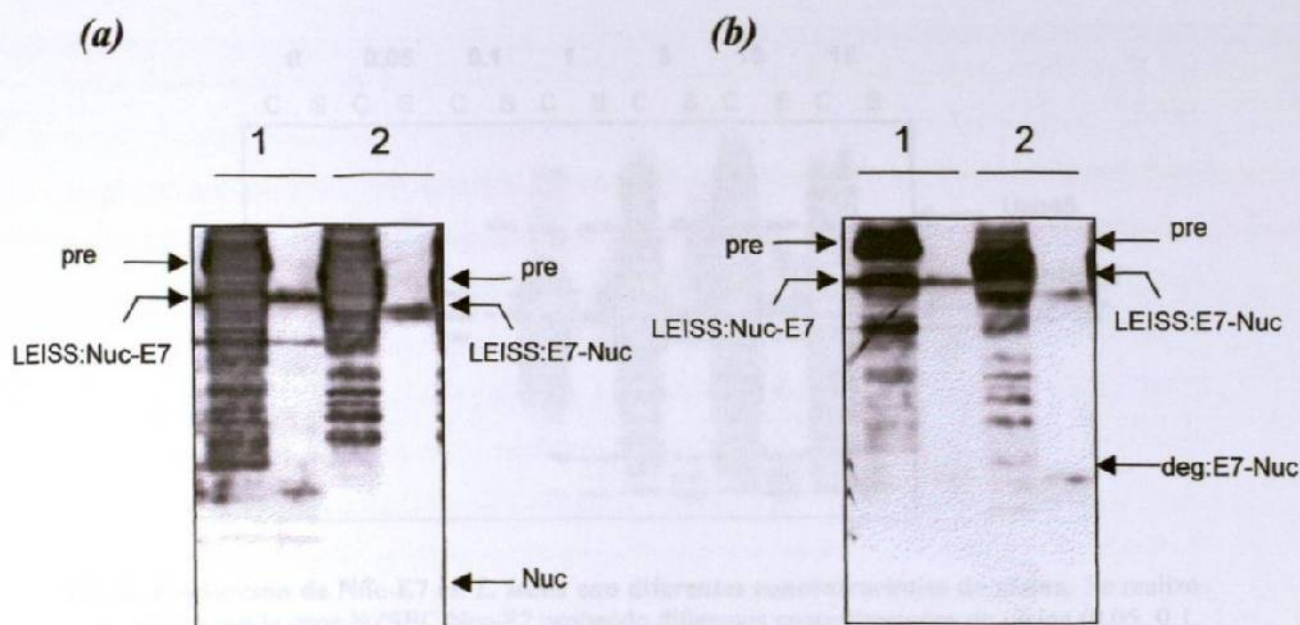
molecular, y que, corresponden a productos de degradación. A pesar de que la migración se hizo bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se observan varias bandas de alto peso molecular (arriba de la forma precursora). Estas bandas pueden ser debido a agregados que no fueron completamente disociados debido al protocolo de extracción de proteínas suave que se utilizó (ver material y métodos, capítulo 2). En la fracción celular de la misma muestra pero revelada con un anticuerpo anti-E7 (Fig. 5b), el perfil de proteínas es diferente y es menor que el de la revelación anti-Nuc. En el sobrenadante de la cepa NZ:LEISS:Nuc-E7, la inmunodetección con anti-Nuc revela una banda mayor del tamaño esperado para la proteína LEISS:Nuc-E7, también se pueden observar otras pequeñas bandas, producto de degradación (Fig. 5a). La inmunodetección con anti-E7 presenta un perfil similar (Fig. 5b).

En la cepa NZLEISS:E7-Nuc el anticuerpo anti-Nuc revela dos bandas mayores en la fracción celular (Fig. 5a), las cuales corresponden a la forma precursora y madura. Curiosamente estos productos presentan un peso molecular ligeramente más pequeño que las formas LEISS:Nuc-E7. Estas extrañas propiedades en la migración de E7 se han observado anteriormente Reinstein y colaboradores (2000), sobre todo cuando la E7 es protegida por su extremo C-. También se observan algunas bandas de alto peso molecular al igual que las formas LEISS:Nuc.E7, y que corresponden probablemente a productos de agregación. De forma interesante, se observa un dramático patrón diferente en las bandas de bajo peso molecular, que aquel observado en las formas LEISS:Nuc-E7, con un menor número de productos degradados y de diferente peso molecular.

Estos resultados muestran que efectivamente la fusión de la proteína E7 con Nuc a ambos extremos, N- ó C- puede efectivamente rescatar a ésta de una degradación.

**3.4.4 Parámetros para la inducción con la nisina.** Dado que los niveles de inducción  $P_{nisA}$  varían de acuerdo a la cantidad de nisina usada (de Ruyter *et al.*, 1996), se realizó una cinética en función de la cantidad de nisina necesaria para la inducción y así determinar las mejores condiciones para la producción de E7 y Nuc-E7 bajo el control del promotor nisina. Para dicho propósito se escogió la cepa NZSEC:Nuc-E7 y se probaron las diferentes concentraciones de nisina (ver material y métodos) 1 hr. Los resultados de la cinética (Fig. 6) muestran que es posible producir proteínas bajo el promotor nisina a niveles tan bajos de concentración como 0.05-0.1 ng/mL de nisina. Sin embargo ya que la cepa analizada este ensayo, es para producir una proteína secretada al medio de cultivo, Nuc-E7, los mejores



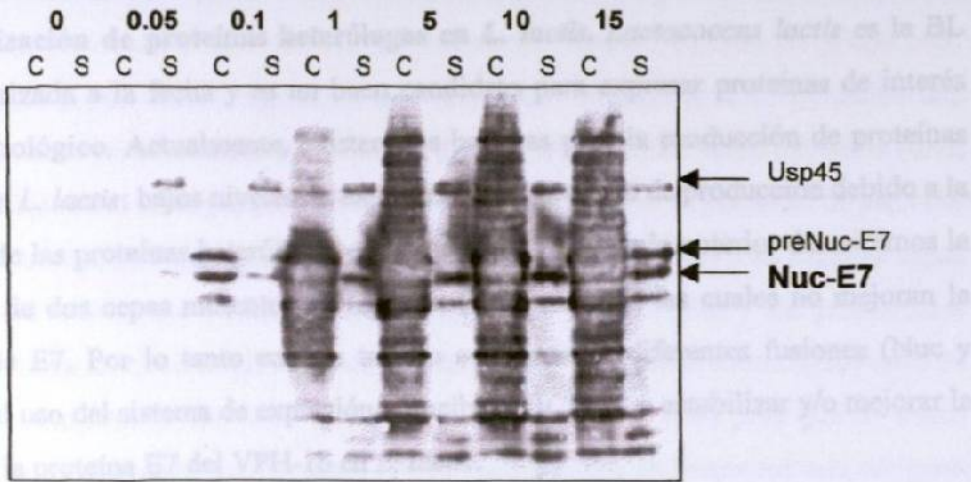


**Fig. 5. La fusión Nuc al extremo N- ó C- de E7 rescata su producción en *L. lactis*.** Se analizó por Western blot la producción de LEISS:Nuc-E7 y LEISS:E7-Nuc de cultivos inducidos de las cepas que portan los plásmidos pLEISS:Nuc-E7 (carril 1) ó pLEISS:E7-Nuc (carril 2). **(a)** Inmunorevelación con anticuerpos anti-Nuc. **(b)** Inmunorevelación con anticuerpos anti-E7. Las flechas indican las posiciones de los precursores (pre), la forma madura LEISS:Nuc-E7, LEISS:E7-Nuc, el control Nuc (SIGMA) y el producto de una posible degradación de la proteína híbrida conteniendo la parte E7 (deg:E7-Nuc). Las demás bandas en el sobrenadante y fracción celular corresponden a productos que contienen la parte Nuc (a) ó E7 (b) y que son el resultado de proteólisis secundarias. C, fracción celular; S, sobrenadante.

niveles de secreción se alcanzan a 10 ng/mL. Después de esta concentración (15 ng/mL, por ejemplo) comienza a haber lisis de las células, ya que se puede observar en el sobrenadante la forma precursora de la proteína, preNuc-E7. Así pues, determinamos que para la producción de E7 en *L. lactis*, la cantidad de nisina necesaria para una óptima inducción es de 10 ng/mL. Curiosamente en este ensayo de Western blot la proteína usp45 (usp45, fracción de sobrenadante) reaccionó con los anticuerpos anti-Nuc.

3.5 DISCUSION

3.5.1 Estabilización



**Fig. 6. Producción de Nuc-E7 en *L. lactis* con diferentes concentraciones de nisina.** Se realizó una cinética con la cepa NZSEC:Nuc-E7 probando diferentes concentraciones de nisina (0.05, 0.1, 1, 5, 10 y 15 ng/mL) para la inducción del promotor  $P_{nisA}$ . El resultado se analizó por Western blot con anticuerpos anti-Nuc. Las flechas indican las posiciones de la proteína madura Nuc-E7 secretada, el precursor preNuc-E7, y la proteína Usp45. C, fracción celular; S, sobrenadante.

que la proteína E7 puede ser protegido de proteólisis cuando es protegido en su extremo N- (Reinstein et al., 2000). Aquí, nosotros demostramos que en *L. lactis* la proteína E7 es protegida de una degradación intracelular cuando es protegida por la fusión de sus dos extremos (Fig. 5). También se demostró que fusionando un péptido sintético (LEISS) a la proteína Nuc-E7 podemos mejorar la ES. Curiosamente al fusionar la proteína LEISS a la proteína E7 nativa, disminuye drásticamente su ES (95% a un 10%) debido quizás a las propiedades intrínsecas de E7.

Los resultados nos llevan a la conclusión que las cargas del extremo N- de la proteína heteróloga a expresar en *L. lactis* (en este caso E7) influyen de manera directa (ya sea positiva o positivamente) con el proceso de translocación. Por otro lado el uso de un sistema de expresión génica inducible es ampliamente recomendable, ya que permite la producción de proteínas que pueden ser tóxicas a la bacteria cuando se expresan a sí mismas (Wells et al., 1995).

En perspectiva en el uso de *L. lactis* para la producción de proteínas heterólogas. El uso de *L. lactis* para expresar y exportar proteínas presenta varias ventajas que la hacen un sistema atractivo para la producción de proteínas heterólogas: 1) algunas cepas no secretan

### 3.5 DISCUSION

**3.5.1 Estabilización de proteínas heterólogas en *L. lactis*.** *Lactococcus lactis* es la BL mejor caracterizada a la fecha y es un buen candidato para expresar proteínas de interés médico ó tecnológico. Actualmente, existen dos barreras para la producción de proteínas heterólogas en *L. lactis*: bajos niveles de expresión y baja calidad de producción debido a la degradación de las proteínas heterólogas expresadas. En el capítulo anterior describimos la construcción de dos cepas mutantes de *L. lactis* (*clpP* y *dnaK*) las cuales no mejoran la producción de E7. Por lo tanto en este trabajo combinamos diferentes fusiones (Nuc y LEISS) con el uso del sistema de expresión inducible, NICE, para estabilizar y/o mejorar la expresión de la proteína E7 del VPH-16 en *L. lactis*.

Para analizar el posible efecto protector de una proteína compacta y resistente, la nucleasa Staphylococcal (Nuc), fusionamos dicha proteína al extremo N- de E7. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente esta proteína híbrida (Nuc-E7) es más estable aún en fase estacionaria (Fig. 4). Trabajos previos en sistemas eucariotes han mostrado que la proteína E7 puede ser protegido de proteólisis cuando es protegido en su extremo N- pero no en el C- (Reinstein *et al.*, 2000). Aquí, nosotros demostramos que en *L. lactis* la proteína E7 es protegida de una degradación intracelular cuando es protegida por cualquiera de sus dos extremos (Fig. 5). También se demostró que fusionando un péptido sintético (LEISS) a la proteína Nuc-E7 podemos mejorar la ES. Curiosamente esta misma fusión LEISS a la proteína E7 nativa, disminuye drásticamente su ES (95% a un 5%), esto debido quizás a las propiedades intrínsecas de E7.

Estos resultados nos llevan a la conclusión que las cargas del extremo N- de la proteína heteróloga a expresar en *L. lactis* (en este caso E7) influyen de manera directa (ya sea negativa o positivamente) con el proceso de translocación. Por otro lado el uso de un sistema de expresión génica inducible es ampliamente recomendable, ya que permite la expresión de proteínas que pueden ser tóxicas a la bacteria cuando se expresan a altos niveles (Wells *et al.*, 1995).

**3.5.2 Perspectivas en el uso de *L. lactis* para la producción de proteínas heterólogas.** El uso de *L. lactis* para expresar y exportar proteínas presenta varias ventajas que la hacen un modelo atractivo para la producción de proteínas heterólogas: 1) algunas cepas no secretan

proteasas u otras proteínas a altos niveles, característica que puede simplificar el análisis de las proteínas producidas; 2) algunas BL son actualmente usadas en procesos industriales (de Vos *et al.*, 1993) lo cual puede facilitar su aceptación como vectores de producción heteróloga; 3) su status GRAS representa una importante ventaja para su potencial uso como un vector vivo en el desarrollo de nuevas vacunas, y su ruta de administración (oral, nasal o vaginal), la hace un organismo de fácil manipulación y sin la necesidad de personal entrenado para su aplicación, además de un bajo costo de producción y 4) algunas cepas poseen actividad antitumoral (Kohwi *et al.*, 1978; Kelkar *et al.*, 1988) y sus propiedades adyuvantes la hacen un buen candidato para propósitos de vacunación contra enfermedades infecciosas. Finalmente, *L. lactis* es una bacteria no comensal y su paso por el tracto digestivo es transitorio por lo cual se puede evitar cualquier tipo de intolerancia al antígeno expresado por esta cepa. En resumen en esta sección se muestra las ventajas y alternativas para mejorar la producción heteróloga en *L. lactis*.

## 3.6 REFERENCIAS

- Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, & van Dijk JM. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2934-2941.
- Bolotin A, Mauger S, Malarme K, Ehrlich SD, & Sorokin A. (1999). Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:27-76.
- Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, & Corthier G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal and oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine Beta-lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8:545-551.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, & Renault P. (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:588-598.
- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, & Corthier G. (2001). Bovine Rotavirus Non-Structural Protein 4 (NSP4) Produced by *Lactococcus lactis* Is Antigenic and Immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1423-1428.
- Gaeng S, Scherer S, Neve H, & Loessner MJ. (2000). Gene cloning and expression of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2951-2958.
- Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
- Gibson TJ. (1984). PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Gil MT, Perez-Arellano I, Buess J, & Perez-Martinez G. (2001). Secretion of the rotavirus VP8\* protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*. 203:269-274.
- Kelkar SM, Shenoy MA, & Kaklij GS. (1988). Antitumor activity of lactic acid bacteria on a solid fibrosarcoma, sarcoma-180 and Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Letters*. 42:73-77.

- Kohwi Y, Imai K, Tamura Z, & Hashimoto Y. (1978). Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann* 69:613-618.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Lachica RV, Genigeorgis C, & Hoepflich PD. (1971). Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Applied Microbiology*. 21:585-587.
- Langella P, & Le Loir Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 32:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1994). Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *Journal of Bacteriology*. 176:5135-5139.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriol*. 180:1895-1903.
- Michaelis L, & Granick S. (1945). Metachromasy of basic dyestuffs. *Journal of American Chemical Society*. 67:1212-1219.
- Mielcarek N, Alonso S, & Loch C. (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 51:55-69.
- Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, Ehrlich SD, Fons M, & Gruss A. (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 179:3068-3072.
- Poquet I, Ehrlich SD, & Gruss A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 7:1904-1912.
- Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, & Schwartz A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*. 19:5944-5950.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, & Langella P. (2002). Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:910-916.

- Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, & Le Page RW. (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotechnology*. 15:653-657.
- de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.
- Shortle D. (1983). A genetic system analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*. 22:181-189.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryuck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, & Remaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 289:1352-1355.
- van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, & Simons G. (1990). Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene*. 95:155-160.
- van Rooijen RJ, Gasson MJ, & de Vos WM. (1992). Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *Journal of Bacteriology*. 174:2273-2280.
- de Vos WM, Huis in't Veld JHJ, & Poolman B. (1993). Special issue. The fourth symposium on Lactic acid bacteria -Genetics, Metabolism and Application. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:1-272.
- Wells JM, Wilson PW, Norton PM, & Le Page RW. (1993). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3954-3959.
- Wells JM, Norton PM, & Le Page RW. (1995). Progress in the Development of Mucosal Vaccines Based on *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*. 40:225-230.

#### 4.1 Producción de la Interleucina-12 murina en *Lactococcus lactis*

##### RESUMEN

La Interleucina-12 (IL-12) es una citocina heterodimérica que juega un papel importante en la inmunidad celular contra muchos agentes microbianos y que ha sido usada exitosamente en inmunoterapia contra el cáncer. La IL-12 también ha mostrado ser buen adyuvante cuando es co-expresado con vacunas de ADN. Por lo tanto esta citocina es un potencial candidato para su uso terapéutico en el tratamiento del cáncer y en el diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas. Desafortunadamente, todas las terapias actuales con la IL-12 son sistemáticas, y han sido muy limitadas debido a su alta toxicidad. En este trabajo diseñamos una cepa recombinante de *Lactococcus lactis*, para una expresión inducible y secreción de la IL-12 murina. Para determinar la actividad biológica de la IL-12 producida por dicha bacteria se analizó la capacidad de inducir interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en células de bazo de ratón *in vitro*. Además, la administración intranasal (*i.n.*) en ratones con la cepa recombinante de *L. lactis* productora de IL-12 resulta en un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ . Este trabajo muestra y apoya por primera vez la aplicación de una bacteria láctica y grado alimenticio como un nuevo vector para la expresión *i.n.* segura de la IL-12.



## 4.2 INTRODUCCION

La interleucina 12 (IL-12), una citocina multifuncional, fue conocida originalmente como factor de maduración de linfocitos T citotóxicos (CTL) y un factor de estimulación de células asesinas naturales (NK) (Kobayashi *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1991; Gubler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991). La IL-12 es una glucoproteína heterodimérica de 70 kDa (IL-12p70) constituida por dos subunidades (p35 y p40) unidas por puentes disulfuro que tiene numerosos efectos en las células T y NK, resultando en un aumento de actividad citotóxica e inducción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). La subunidad p40 es importante para la unión a receptores celulares y la p35 es responsable para la especificidad entre especies (Chizzonite *et al.*, 1990; Schoenhaut *et al.*, 1992). En modelos animales la IL-12 ofrece protección contra varias infecciones bacterianas (Hultgren *et al.*, 2001). Esta citocina también ha demostrado bloquear la angiogenesis (nueva formación de vasos sanguíneos) y sus efectos inmunomoduladores son benéficos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Voest *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 2000). Dada las propiedades estimuladoras de la IL-12, existe un continuo interés en el uso de esta citocina como un adyuvante en el desarrollo de nuevas vacunas (Arulanandam *et al.*, 1999). Además varios grupos de investigación han demostrado que la IL-12 estimula una respuesta de anticuerpos IgG en suero (Metzger *et al.*, 1996, 1997; Arulanandam & Metzger, 1999).

Aunque la administración local de IL-12 tiene un efecto antitumoral *in vivo* causando la regresión de tumores bien establecidos y reduce la metástasis en modelos animales (Brunda *et al.*, 1993; Nastala *et al.*, 1994; Rakhmilevich *et al.*, 1996), la terapia sistémica con IL-12 ha mostrado una marcada citotoxicidad (Sarmiento *et al.*, 1994; Lui *et al.*, 2001) y dos pacientes han muerto en ensayos clínicos (Cohen, 1995). Adicionalmente el tratamiento intratumoral de ratones con un virus vaccinia que expresa la IL-12 induce una significativa inhibición del crecimiento tumoral pero con claros signos de toxicidad (Chen *et al.*, 2001). Es pues de gran interés desarrollar nuevas formas de expresión de la IL-12 a niveles controlados de administración local.

Las superficies en mucosas representan la primera defensa contra microorganismos patogénicos, por lo tanto es interesante el desarrollo de nuevos vectores para expresar la IL-12 por una ruta en mucosas. Mientras que el tratamiento sistémico con la IL-12 ha

como sistémica. No obstante, las actuales estrategias para expresar la IL-12 por mucosas son muy limitadas debido a una falta de vectores que puedan ser administrados de manera segura al humano. El uso de bacterias vivas como vectores para la expresión de proteínas heterólogas ha recibido especial interés en el desarrollo de vacunas en la última década. Sin embargo la mayoría de estos vectores bacterianos actualmente en uso son derivados de microorganismos patógenos e invasivos (por ejemplo, *Escherichia coli* y cepas atenuadas de *Mycobacterium* y *Salmonella*).

Las bacterias lácticas (BL) son organismos Gram positivos y no patógenos, considerados buenos candidatos para el desarrollo de vacunas vivas orales. *Lactococcus lactis*, es la BL modelo y dado que ha sido extensamente manipulada para la producción de proteínas heterólogas (Le Loir *et al.*, 1998; Steidler *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999; Enouf *et al.*, 2001; Chatel *et al.*, 2001, Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002), incluyendo algunos antígenos de origen bacteriano o viral (Enouf *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002), es de particular interés el desarrollo de vacunas orales o nasales usando éste organismo GRAS. *Lactococcus lactis* no sobrevive en el tracto digestivo de modelos animales y humanos. Esto puede representar una ventaja comparado al uso de bacterias comensales ya que reduce el riesgo de cualquier tolerancia al antígeno expresado. Tanto la inmunidad en mucosas como la tolerancia son cruciales para mantener la integridad del organismo. Por un lado la mucosa es la mayor puerta de entrada de patógenos, los cuales deben de ser combatidos; por el otro, el sistema digestivo contiene una enorme cantidad de antígenos presentes en los alimentos los cuales deben de ser tolerados. La inmunidad en mucosas hacia los patógenos previene las infecciones mientras que la tolerancia en mucosas a los antígenos presentes en los alimentos previene la hipersensibilidad. Entre las numerosas funciones de la regulación de la respuesta inmune, se ha demostrado que la IL-12 previene la tolerancia en mucosas (Chen *et al.*, 2000; Claessen *et al.*, 1996, Van Parijs *et al.*, 1997). Varias bacterias Gram positivas, incluyendo algunas especies de BL han sido reportadas como potentes inductores de la IL-12 (Miettinen *et al.*, 1998; Hessle *et al.*, 1999, Hessle *et al.*, 2000). Tomando en cuenta todas estas características, resulta de gran interés la construcción de una cepa de *L. lactis* productora de la IL-12. Dicha cepa puede servir como un potente adyuvante en el desarrollo de vacunas vivas o en el tratamiento de tumores.

La IL-12 ha sido producida en sistemas eucariotes y expresada por vectores retrovirales y técnicas de pistolas génicas (Rakhmievich, *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Lui *et al.*, 2001; Mazzolini *et al.*, 2001). La producción de la IL-12 requiere el ensamblaje de dos subunidades mediante la formación de puentes disulfuro. En contraste a las bacterias Gram negativas, la formación de puentes disulfuro en las bacterias Gram positivas ha sido pobremente documentado. Solamente unas pocas proteínas extracitoplasmáticas con puentes disulfuro han sido identificadas en *Bacillus subtilis* incluyendo proteínas involucradas en la "toma" de ADN por células competentes (Chung *et al.*, 1998), y una bacteriocina lantibiótica (Paik *et al.*, 1998). Además, se ha reportado la formación de puentes disulfuro en *B. subtilis* en la producción de proteínas heterólogas tales como la TEM  $\beta$ -lactamasa (Bolhuis *et al.*, 1999a) y la PhoA *Escherichia coli* (Payne & Jackson, 1991). De igual forma se ha logrado de forma exitosa la producción de algunas bacteriocinas con puentes disulfuro en BL sugiriendo la habilidad de estos organismos para catalizar la formación de dichos enlaces en proteínas extracelulares (Fleury *et al.*, 1996). Finalmente, no existen reportes de secreción de proteínas heterólogas con puentes disulfuros en *L. lactis*. Este trabajo demuestra la capacidad de *L. lactis* para producir y secretar dos formas de IL-12 biológicamente activas, una citocina compleja compuesta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro: una forma dimérica (expresión de p35 y p40, IL-12p70) y una forma monomérica (ambas subunidades fusionadas por un péptido flexible, scIL-12). La cepa recombinante reportada en este trabajo puede representar un excelente vector para co-expresar antígenos de interés médico y marcar un nuevo paso en el desarrollo de vacunas vivas de administración oral o nasal.

## 4.3 MATERIAL Y METODOS

**4.3.1 Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos.** Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo son listados en la Tabla 1. *Lactococcus lactis* y *Escherichia coli* se crecieron de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2. Los plásmidos fueron mantenidos por la adición de los siguientes antibióticos (concentración en microgramos por mililitro,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): para *L. lactis*, cloranfenicol (5) y para *E. coli* (10) o ampicilina (100).

Tabla 1: Cepas y plásmidos usados.

Cepa	Genotipo		Referencia
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE, hsd, <math>\Delta</math>S, thi, <math>\Delta</math>(lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZAM15)</i>		Gibson, 1984.
<i>L. lactis</i> MG1363	Cepa silvestre. Sin plásmidos		Gasson, 1983.
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 (genes <i>nisRK</i> en cromosoma). Sin plásmidos		Kuipers et al., 1998.
Plásmidos	Replicón	Características del plásmido y cassettes	Referencia
pBS-SK-II+	ColE1	Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pWRG3169	ColE1	Ap <sup>r</sup> , derivado de pBS con secuencias codificantes para las subunidades p35 y p40.	Rakhmilevich et al., 1996
pCR-TOPO	ColE1	Ap <sup>r</sup>	Invitrogen
pCR-TOPO: $\Delta$ p35exon1	ori pUC	Ap <sup>r</sup> , fragmento de PCR que codifica para el primer exón de la subunidad p35 sin su péptido señal.	Este trabajo
pCR-TOPO:p35exon2	ori pUC	Ap <sup>r</sup> fragmento de PCR que codifica para el segundo exón de la subunidad p35	Este trabajo
pCR-TOPO: $\Delta$ p35	ori pUC	Ap <sup>r</sup> , cassette de expresión de la subunidad p35 sin intrón	Este trabajo
pBS: $\Delta$ p40:trpA	ColE1	Ap <sup>r</sup> , fragmento de PCR que codifica para la subunidad p40 sin su péptido señal.	Este trabajo
pBS:SP <sub>Exp4</sub>	ColE1	Ap <sup>r</sup> , fragmento de PCR codificante para el péptido señal SP <sub>Exp4</sub>	Este trabajo
pBS:SP <sub>Exp4</sub> :p40:trpA	ColE1	Ap <sup>r</sup> , cassette de expresión de la subunidad p40: SP <sub>Exp4</sub> :p40:trpA bajo el control del promotor P <sub>nat</sub>	Este trabajo
pSEC:E7	pWV01	Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión del precursor SP <sub>Exp4</sub> :E7 bajo el control del promotor P <sub>nat</sub>	Capítulo 2
pSEC:p35	pWV01	Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de la subunidad p35: SP <sub>Exp4</sub> :p35 bajo el control del promotor P <sub>nat</sub>	Este trabajo
pSEC:p35-p40	pWV01	Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de las subunidades p35 y p40 de la IL-12 bajo el control del promotor P <sub>nat</sub>	Este trabajo
pCR:TOPO:scIL12	ori pUC	Ap <sup>r</sup> ; fragmento de PCR que codifica para la IL-12 de fusión: scIL-12.	Este trabajo
pSEC:scIL-12	pWV01	Cm <sup>r</sup> ; cassette de expresión de la scIL-12 bajo el control del promotor P <sub>nat</sub>	Este trabajo

\*Genes de resistencia a: Ap<sup>r</sup>, ampicilina; Cm<sup>r</sup>, cloranfenicol.

**4.3.2 Manipulaciones de ADN y métodos usados.** Todos los métodos usados en este capítulo (asilamiento de ADN, transformación, PCR, Western blot, etc.) se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2. La concentración de la IL-12 secretada al medio de cultivo se midió usando un kit de ELISA que reconoce únicamente el heterodímero de la IL-12 (IL-12p70) (R&D Systems).

**4.3.3 Mutagénesis dirigida para eliminar el intrón de la subunidad p35.** Se aislaron por PCR las subunidades p35 y p40 del vector pWRG1369 el cual ha sido descrito anteriormente como funcional en un sistema eucariote (gentilmente donado por A. Rakhmievich, Tabla 1, Rakhmievich *et al.*, 1996). Análisis de la secuencia de la subunidad p35 revelaron un intrón (ver mas adelante). Aunque este intrón puede ser bien procesado en sistemas eucariotes, este no es el caso para nuestro sistema procariote, ya que en dichos organismos no ocurre splicing del ARN. Para eliminar dicho intrón se realizó una mutagénesis dirigida por PCR sobre la subunidad p35. Primero, se amplificaron por PCR los dos exones de la subunidad p35, se subclonaron en el vector pCR-TOPO (Invitrogen) y se ligaron para generar una subunidad p35 sin intrón y sin su péptido señal (SP,  $\Delta$ p35). El primer exón fue amplificado con los oligos: 5'-p35 (5'-GATGCATCAGAGAGGGTCATTCCAGTCTCTGGA-3') para la cadena codificante y 5'-p35-start (5'-GGGGATCCTCTTGTGTGGAAGAAGTCTCTCT-3') para la cadena complementaria (Fig. 4). Para el segundo exón se usaron los oligos: 3'-p35-stop (5'-GGGGATCCTGCCTGCCCCCACAG AAGACG-3') para la cadena codificante y 3'-p35 (5'-GGAATTCTCAGGCGGAGCTCAGATAGCCCA-3') para la cadena complementaria. Los oligos fueron diseñados de tal manera que se introdujera un sitio *Bam*HI sin modificar la secuencia de aminoácidos. Los dos exones fueron clonados en el vector pCR-TOPO resultando en pCR-TOPO: $\Delta$ p35exon1 y pCR-TOPO:p35exon2, respectivamente. Se aisló el fragmento codificante para p35exon2 con las enzimas *Bam*HI/*Xba*I-Klenow del vector CR-TOPO:p35exon2 y se ligó en el vector pCR-TOPO:  $\Delta$ p35exon1 digerido con *Bam*HI/*Sma*I resultando en pCR-TOPO:  $\Delta$ p35.

**4.3.4 Construcción de una cepa recombinante de *L. lactis* que expresa las subunidades p35 y p40 de la IL-12.** Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que codifica para la región madura de la subunidad p40 (desprovista de su SP,  $\Delta$ p40) del plásmido pWRG3169 (Rakhmievich *et al.*, 1996) y se subclonó en el vector pVE8001 (Poquet *et al.*, 1998) digerido con *Hinc*II. El vector resultante (pBS: $\Delta$ p40:trpA) tiene un terminado

transcripcional (*trpA*) que ha sido usado exitosamente para expresar proteínas heterólogas en *L. lactis* (Poquet *et al.*, 1998; Capítulo 2 y 3). La secuencia de los oligos usados fue: 5'-p40 (5'-GATGCATCAGAGATGTGGGAGCTGGAGAAAGAC-3') para la cadena codificante y 3'-p40 (5'-GGAGCTCCTAGGATCGGACCCTGCAGGGAA-3') para la complementaria. Posteriormente se realizó una serie de construcciones para fusionar dos SP procariotes en las subunidades p35 y p40. Primero se amplificó por PCR un fragmento de ADN del vector pFUN:Exp4 (Poquet *et al.*, 1998); dicho fragmento contiene el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el SP de una probable proteína de secreción en *L. lactis* Exp4 (SP<sub>Exp4</sub>, Poquet *et al.*, 1998). Las secuencias de los oligos usados fue: 5'-Exp4 (5'-GGGTACCTTAAGGAGATATAAAAATGAA-3') para la cadena codificante y 3'-Exp4 (5'-GATGCATCATCAGCAAATACAACGGC-3') para la complementaria. Este producto de PCR se clonó en el vector pVE8001 digerido con *HincII*, resultando en pBS:SP<sub>Exp4</sub>. Posteriormente, se aisló el cassette  $\Delta p40:trpA$  del vector pBS: $\Delta p40:trpA$  con las enzimas *NsiI/KpnI* y se clonó en el plásmido pBS:SP<sub>Exp4</sub> digerido con las mismas enzimas, obteniendo pBS:SP<sub>Exp4</sub>:p40:trpA. Para la fusión del SP a la subunidad p35, se aisló el cassette  $\Delta p35$  del vector pBS: $\Delta p35$  con las enzimas *NsiI/EcoRI* y se clonó en el vector pSEC:E7 (capítulo 2) digerido con las mismas enzimas, para generar pSEC:p35. En este plásmido el gene *p35* esta fusionado al RBS y el SP<sub>Usp45</sub> de la Usp45; además, la expresión de esta subunidad esta bajo el control del promotor inducible  $P_{trpA}$ . Finalmente para la fusión de ambas subunidades en el mismo vector, se obtuvo el cassette SP<sub>Exp4</sub>:p40:trpA del vector pBS:p40:trpA digiriendo con las enzimas *KpnI/BamHI*-Klenow y se clonó en el vector pSEC:p35 digerido con *KpnI/SmaI* resultando así en el plásmido pSEC:p35-p40 (Fig. 5). Este vector, que permite la expresión de las subunidades p35 y p40 a través de un solo transcrito fue introducido en la cepa NZ9000 de *L. lactis*. Esta cepa se nombró NZSEC:p35-p40.

**4.3.5 Construcción del cassette de expresión de la IL-12 de fusión.** Para la construcción del cassette de expresión de la IL-12 de fusión, se amplificó por PCR el gene *scIL-12* usando como template el vector pCDNA3:IL12 (gentilmente donado por P. Melby). Los oligos usados fueron: 5'-IL12 (5'-GATGCATCAGAGATGTGGGAGCTGGAGAAAGAC-3') para la cadena codificante y 3'-IL12 (5'-GGAATTCTCAGGCGGAGCTCAGATAGCCCA-3') para la complementaria. El producto de PCR obtenido se subclonó en el vector

pCR:TOPO (Invitrogen) resultando en pCR:TOPO:IL12 (Tabla 1). Posteriormente, se aisló el gene *scIL-12* de este vector con las enzimas *NsiI/NotI* y se clonó en el vector pSEC:E7 digerido con las mismas enzimas, resultando en pSEC:IL12 (Fig. 5). Este plásmido se introdujo en la cepa NZ9000 de *L. lactis* para generar la cepa NZSEC:scIL-12

**4.3.6 Animales.** Los ratones C57BL/6 se adquirieron en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME) y fueron mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL, México. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité institucional de estudios animales.

**4.3.7 Ensayos de inducción *in vitro* de IFN- $\gamma$ .** Se obtuvieron células de bazo de 4 ratones (6-8 semanas de edad), y se separaron las células mononucleares por un gradiente de densidad en Ficoll-Histopaque (SIGMA). Se sembró un total de  $2 \times 10^6$  células/mL en medio AIM-V (GIBCO) en placas de 24 pozos, 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Estas células se incubaron con 1 ng de IL-12 recombinante (R&D Systems) o el número de *L. lactis* recombinantes para dar la misma concentración que la del control. Después de 48 hrs. de incubación se cosecharon los sobrenadantes y se midió la presencia de IFN- $\gamma$  en el medio por ELISA (R&D Systems). Todas las muestras se prepararon por triplicado.

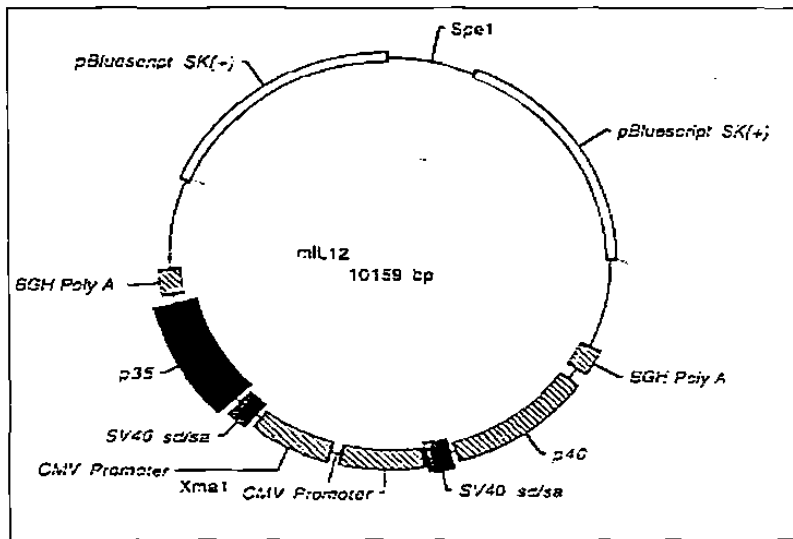
**4.3.8 Administración intranasal de los lactococos que expresan la IL-12.** A grupos de tres ratones, se les administró intranasalmente (*i.n.*) los lactococos recombinantes que expresan la IL-12, la cepa silvestre (*wr*) ó PBS estéril (buffer de fosfato salino). Para esto los ratones fueron parcialmente anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de Xilacina y Ketamina (Cheminova de México, S.A. de C.V.). Un total de  $1 \times 10^9$  CFU (unidades formadoras de colonia) se resuspendieron en 10  $\mu$ L de PBS estéril y se administraron 5  $\mu$ L en cada nostrilo del ratón con una micropipeta a los días 1, 14 y 28.

**4.3.9 Ensayo de inducción de IFN- $\gamma$ .** Se obtuvieron los bazos de los animales tratados *i.n.* con *L. lactis* ó PBS al día 35, y se aislaron las células mononucleares tal y como se describió para el ensayo de inducción *in vitro*. Se reestimularon las células de bazo con 50  $\mu$ L de Phytohemagglutinin (PHA, M Form, GIBCO). Después de 24 hrs. de incubación se recupero el sobrenadante de las células reestimuladas y se midió la presencia de IFN- $\gamma$ .

**4.3.10 Estadísticas.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  una desviación estándar.

## 4.4 RESULTADOS

**4.4.1 Las subunidades p35 y p40 son secretadas y procesadas correctamente por *L. lactis*.** En este trabajo se desarrollo un cassette bistrónico para expresar la IL-12, en el cual un RBS interno une ambas subunidades (p35 y p40) y bajo el control del promotor inducible  $P_{nisA}$ . Para obtener los genes p35 y p40 de la IL-12 murina, usamos un vector descrito anteriormente en un sistema eucariote (pWRG3169, Fig. 1; Rakhmievich *et al.*, 1996). Sin embargo, en los productos de PCR mostrados en la figura 2 (700 pb, la subunidad p35 y 960 pb la p40), la subunidad p35 presenta un tamaño mayor que el esperado de acuerdo a la secuencia de nucleótidos publicada en la base de datos *GenBank* (600 pb, No Acceso. M86672).



**Fig. 1. Plásmido pWRG3169.**

Esto se observó en varios experimentos en geles de agarosa y de acrilamida (mayor resolución) y fue consistente aún y cuando el plásmido usado como molde para el PCR (pWRG3169) fue enviado dos veces por el Dr. A. Rakhmievich. Por lo tanto se optó por secuenciar este producto de PCR. El resultado de esta secuenciación es que las ~70 pb de más, encontradas en el PCR, corresponden a un intron (Fig. 3), el cual es seguramente procesado en células de mamíferos, pero no en células procariones (*L. lactis*). Para eliminar este intrón se procedió a hacer una mutagénesis dirigida por PCR (ver material y métodos,



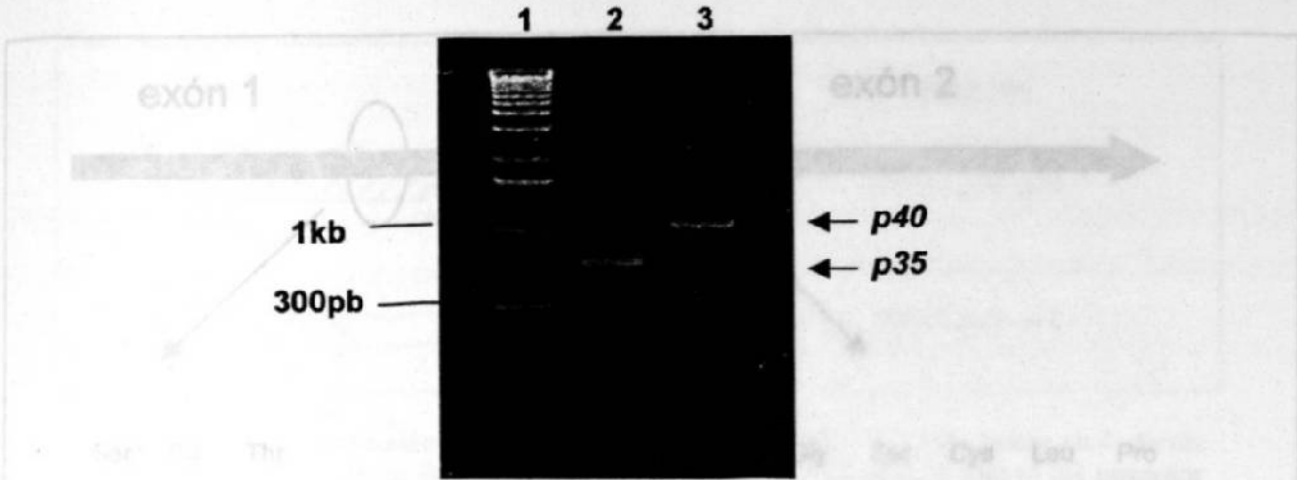


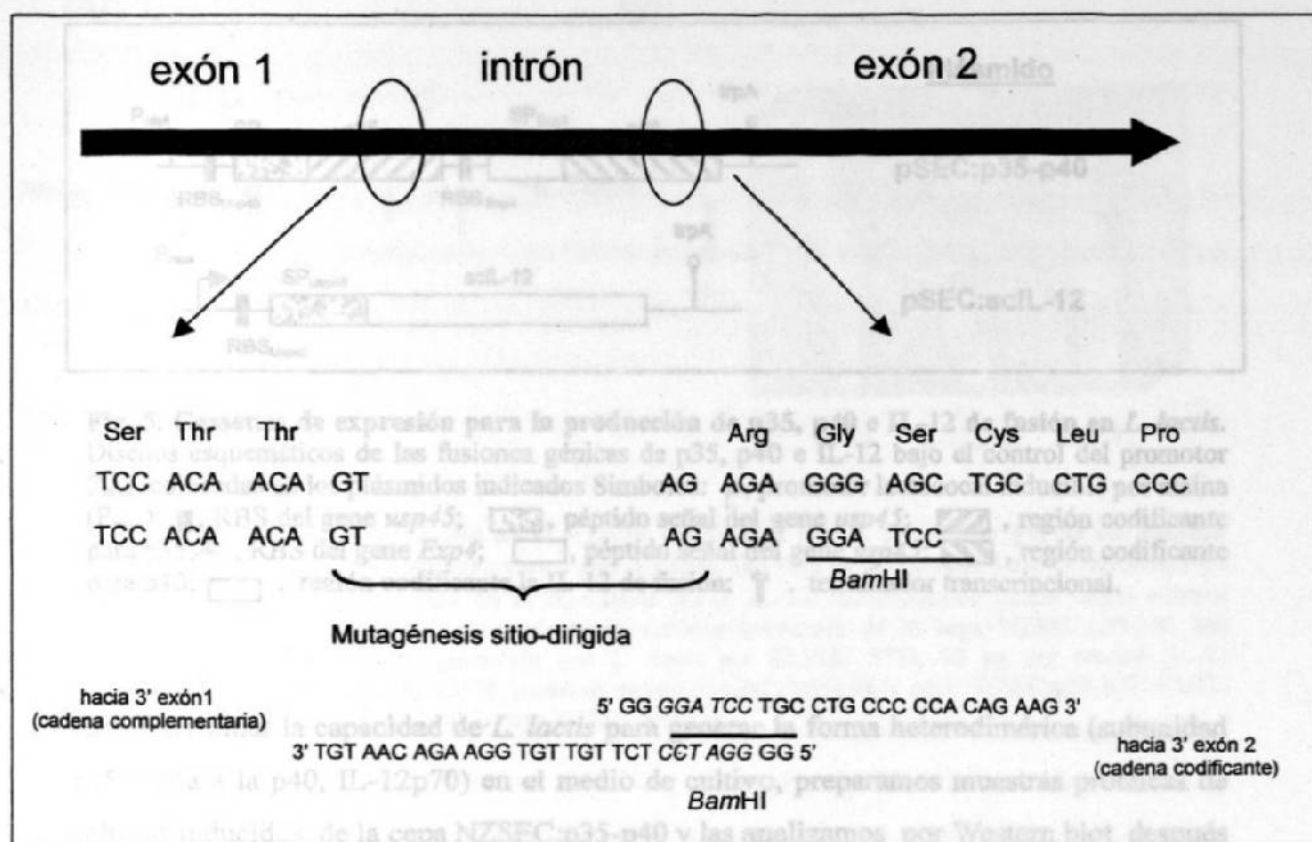
Fig. 2. Amplificación de los genes *p35* y *p40*. Carril 1, marcador de peso molecular 1 kb; carril 2; gene *p35*; carril 3, gene *p40*. Las bandas esperadas son señaladas con flechas.

Fig. 4), el resultado final es una subunidad *p35* con un nuevo sitio, *Bam*HI, el cual no modifica la secuencia de aminoácidos. Una vez eliminado el intrón de la subunidad *p35*, se continuó con la construcción del cassette pSEC:*p35*-*p40*, tal y como se describe en material y métodos. Este vector final tiene el terminador transcripcional, *trpA*, fusionado al extremo 3' del gene *p40* (Fig. 5). Esta construcción fue establecida en la cepa NZ9000 de *L. lactis* y se analizó su capacidad para secretar las subunidades *p35* y *p40* (Fig. 6a).

```

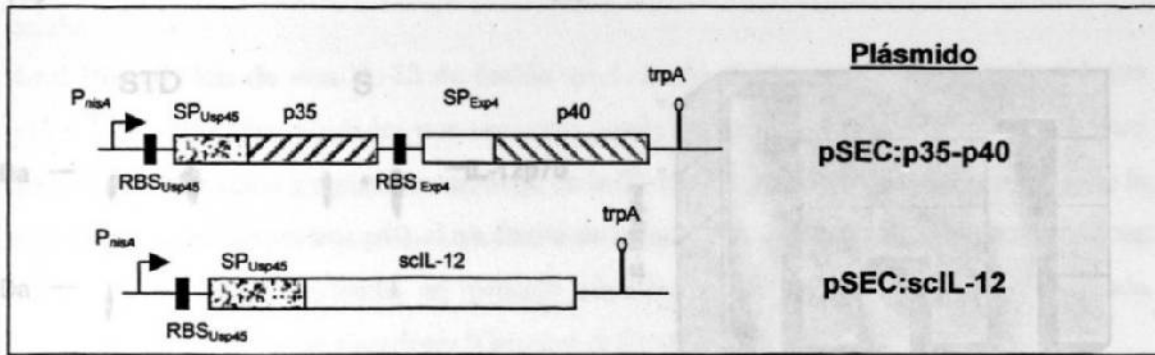
GATGCATCAGAGAGGGTCAATTCAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCCGA
AACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAACTGAAACATTAT
TCCTGCACTGCTGAAGACATCGATCATGAAGACATCACACGGGACCAAACCAGCACATTG
AAGACCTGTTTACCACTGGAACACACAAGAACGAGAGTTGCCTGGCTACTAGAGAGACT
TCTTCCACAACAGTAAGTAGGCACTCTAAGGGTTCCTTCCCCATGACGGATTTCATAACAC
TGATGCCTGGTCATTCTTTCTCTAGAGAGGGAGCTGCCTGCCCCACAGAAGACGTCTTT
GATGATGACCCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGAGGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTT
CCAGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAACCATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGG
CATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTCTCTGAATCATAATGGCGAGACTCTGCG
CCAGAAACCTCCTGTGGGAGAAGCAGACCCTTACAGAGTGAAAATGAAGCTCTGCATCCT
GCTTACGCCTTCAGCACCCGCGTCGTGACCATCAACAGGGTGATGGGCTATCTGAGCTC
CGCCTGAGAATTCC
    
```

Fig. 3. Secuenciación del producto de PCR de la subunidad *p35*. Se secuenció el producto de PCR de la subunidad *p35* obtenido del vector pWRG3169. Como observamos en la secuencia, existe un fragmento adicional de 73 nucleótidos (negritas) el cual analizando las secuencias consenso del procesamiento de ARN en eucariotes, indican que se trata de un intrón.



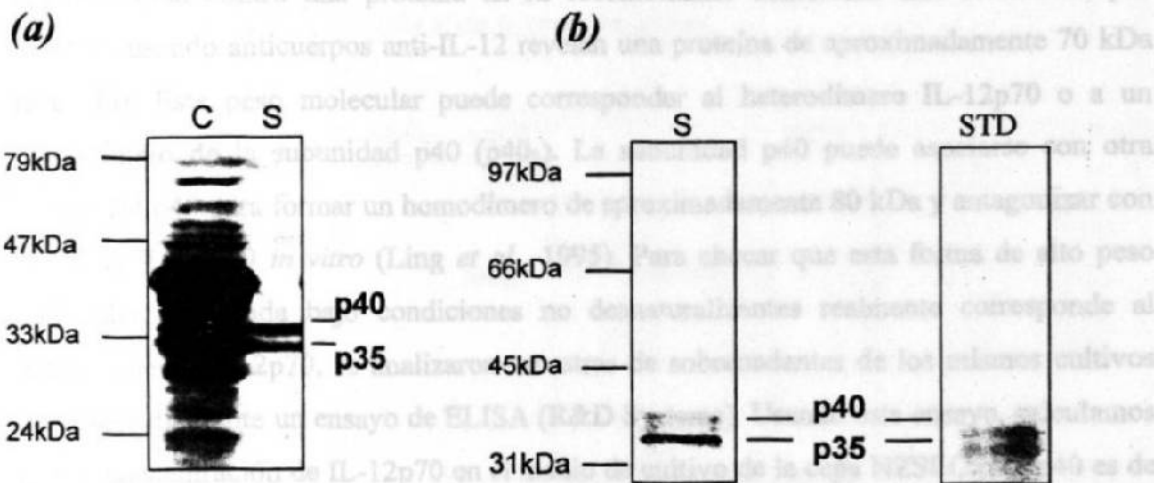
**Fig. 4. Mutagénesis sitio-dirigida en la subunidad p35.** Para eliminar el intrón presente en la subunidad p35, se realizó una mutagénesis sitio-dirigida con oligos específicos. Para elegir los oligos a utilizar se analizaron los codones de los tres aminoácidos adyacentes a ambos lados del intrón (cursivas) y se encontró un sitio *Bam*HI (subrayado y negritas). Posteriormente se diseñaron dos oligos poseyendo estos sitios (oligo p35 inicio y oligo p35 fin) con los cuales se hicieron dos reacciones de PCR, usando como complemento los oligos 5'-p35 y 3'-p35 (ver material y métodos). Una vez obtenidos estos dos productos se digirieron con la enzima *Bam*HI y se ligaron, para así obtener la subunidad p35 reparada.

Las muestras de cultivos inducidos se tomaron en fase exponencial ( $OD_{600}=1$ ). Después de la inducción, análisis por Western blot usando un anticuerpo específico anti-IL12 murino (R&D Systems) revela dos bandas en el sobrenadante del tamaño esperado para la p35 y p40 silvestres (Fig. 6b), sin embargo la eficiencia de secreción es muy baja (~5%), y la mayoría de la proteína permanece asociada a la fracción celular y/o a la pared celular tal y como se ha observado para muchas otras proteínas en organismos Gram positivos (Bolhuis *et al.*, 1999b, Dieye *et al.*, 2001; capítulo 2).

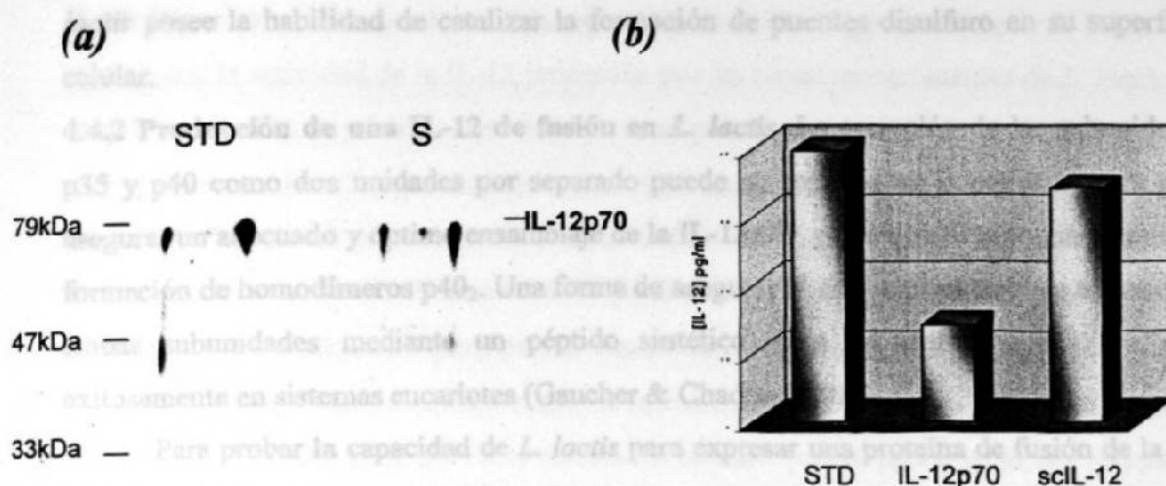


**Fig. 5. Cassettes de expresión para la producción de p35, p40 e IL-12 de fusión en *L. lactis*.** Diseños esquemáticos de las fusiones génicas de p35, p40 e IL-12 bajo el control del promotor  $P_{nisA}$  colocadas en los plásmidos indicados. Símbolos:  $\blacktriangleright$ , promotor lactococal inducible por nisina ( $P_{nisA}$ );  $\blacksquare$ , RBS del gene *usp45*;  $\square$  con rayas, péptido señal del gene *usp45*;  $\square$  con rayas, región codificante para p35;  $\blacksquare$ , RBS del gene *Exp4*;  $\square$  con rayas, péptido señal del gene *usp45*;  $\square$  con rayas, región codificante para p40;  $\square$ , región codificante la IL-12 de fusión;  $\Uparrow$ , terminador transcripcional.

Para determinar la capacidad de *L. lactis* para generar la forma heterodimérica (subunidad p35 unida a la p40, IL-12p70) en el medio de cultivo, preparamos muestras proteicas de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40 y las analizamos por Western blot después



**Fig. 6. Análisis de la producción de IL-12 por *L. lactis*.** Se analizó por Western blot la producción de las subunidades p35 y p40 de la IL-12 de cultivos inducidos del lactococos recombinante. (a) C, fracción celular de la cepa NZSEC:p35-p40 expresando las subunidades p35 y p40 (IL-12p70); S, muestras de sobrenadante. (b) Muestras de sobrenadante de la cepa NZSEC:p35-p40 (S) comparadas contra una IL-12 comercial (STD, R&D Systems). Las posiciones del marcador de peso molecular son indicadas a la izquierda.



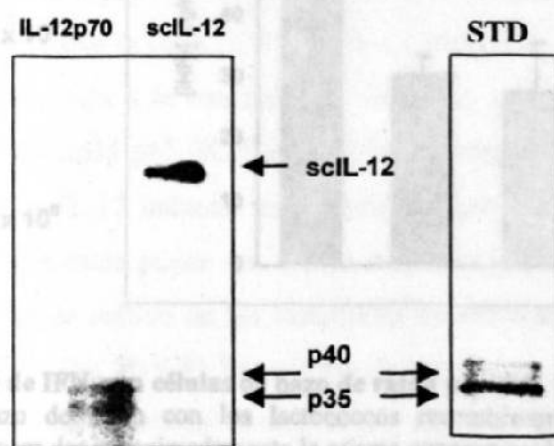
**Fig. 7. Análisis de la producción de IL-12p70 producida por *L. lactis* por gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes y por ELISA. (a)** Gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes y Western blot de la IL-12p70. STD, IL-12 recombinante usada como control (R&D Systems); S, muestra de sobrenadante de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40. **(b)** Cuantificación de la IL-12p70 producida por *L. lactis* por ELISA. STD, 80 pg del control (IL-12 recombinante R&D Systems); IL-12p70, muestras de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:p35-p40; y scIL-12, muestras de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:scIL-12.

de migrar las muestras en un gel de acrilimida bajo condiciones no desnaturalizantes y comparándola contra una proteína IL-12 recombinante comercial. Los resultados por Western usando anticuerpos anti-IL-12 revelan una proteína de aproximadamente 70 kDa (Fig. 7a). Este peso molecular puede corresponder al heterodímero IL-12p70 o a un homodímero de la subunidad p40 ( $p40_2$ ). La subunidad p40 puede asociarse con otra subunidad p40 para formar un homodímero de aproximadamente 80 kDa y antagonizar con la forma IL-12p70 *in vitro* (Ling *et al.*, 1995). Para checar que esta forma de alto peso molecular observada bajo condiciones no desnaturalizantes realmente corresponde al heterodímero IL-12p70, se analizaron muestras de sobrenadantes de los mismos cultivos inducidos mediante un ensayo de ELISA (R&D Systems). Usando este ensayo, calculamos que la concentración de IL-12p70 en el medio de cultivo de la cepa NZSEC:p35-p40 es de 25 pg/ml (Fig. 7b). Como control, se incluyó una IL-12 recombinante (80pg/mL) incluida en el kit. Estos resultados muestran que: i) *L. lactis* es capaz de secretar las subunidades p35 y p40 de la IL-12 y ii) que al menos parte de estas subunidades son adecuadamente ensambladas para formar la forma activa de esta citocina, IL-12p70. Esto sugiere que *L.*

*lactis* posee la habilidad de catalizar la formación de puentes disulfuro en su superficie celular.

**4.4.2 Producción de una IL-12 de fusión en *L. lactis*.** La secreción de las subunidades p35 y p40 como dos unidades por separado puede no representar la mejor manera para asegurar un adecuado y óptimo ensamblaje de la IL-12p70, ya que esta estrategia permite la formación de homodímeros p40<sub>2</sub>. Una forma de asegurar el correcto ensamblaje es fusionar ambas subunidades mediante un péptido sintético. Esta estrategia ha sido probada exitosamente en sistemas eucariotes (Gaucher & Chadee, 2001).

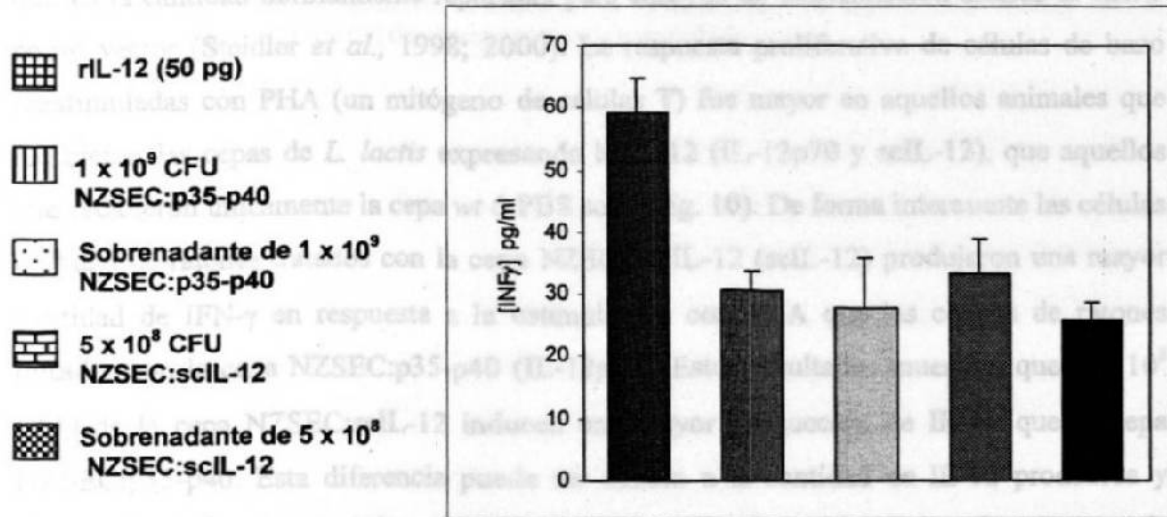
Para probar la capacidad de *L. lactis* para expresar una proteína de fusión de la IL-12 (scIL-12) se usó la cepa NZSEC:scIL-12. Para esto, se prepararon muestras proteicas de cultivos inducidos de dicha cepa y se compararon por Western blot contra muestras de la cepa NZSEC:p35-p40. Los análisis por inmunorevelación usando anticuerpos anti-IL-12, revelan una clara banda del tamaño esperado para la scIL-12 (70 kDa, Fig. 8). La cantidad de scIL-12 secretada al medio de cultivo se estimó del mismo modo que para el de las subunidades p35 y p40 y se comparó la producción de ambas formas, además de incluir como control la IL-12 recombinante (STD, Fig. 7b). La cantidad de scIL-12 se estimó dos veces mayor que el de la IL-12p70 (65 pg/mL versus 25 pg/mL; Fig. 7b). Estos resultados muestran que *L. lactis* secreta eficientemente la scIL-12, la cual es procesada en una conformación activa comparable al de la proteína nativa.



**Fig. 8. Producción de la scIL-12 por *L. lactis*.** Se analizaron por Western blot muestras de sobrenadante de cultivos inducidos de la cepa NZSEC:scIL-12 (scIL-12) y se compararon con muestras de cultivos de la cepa NZSEC:p35-p40 (IL-12p70) y con el control (STD).

**4.4.3 Caracterización funcional (bioactividad) de la IL-12 producida por *L. lactis*.** Para determinar la actividad de la IL-12 producida por las cepas recombinantes de *L. lactis* (IL-12p70 y scIL-12), se midió la capacidad de estas proteínas para inducir producción de IFN- $\gamma$  tal y como se describió en material y métodos. Las células de bazo se cultivaron con 50 pg/mL de una IL-12 recombinante comercial (rIL-12), además se calculó la cantidad de sobrenadante o cultivo celular necesario para obtener iguales cantidades de IL-12 y se adicionaron a las células de bazo para el ensayo de inducción de IFN- $\gamma$ . Después de 48 hrs de incubación se obtuvo el sobrenadante de las células de bazo y se midió la concentración de IFN- $\gamma$  por ELISA (Fig. 9). Estos resultados revelan que 50 pg de la rIL-12 inducen la producción de 60 pg/mL de IFN- $\gamma$  mientras que la scIL-12 producida por  $5 \times 10^8$  CFU de la cepa NZSEC:scIL-12 ó el contenido del sobrenadante correspondiente inducen la producción de 33 pg/ml y 26 pg/mL, respectivamente. La cepa NZSEC:p35-p40 productora de la forma IL-12p70 muestra resultados similares: 30 pg/mL para  $1 \times 10^9$  CFU y 28 pg/mL para su sobrenadante (Fig. 9). Como control negativo se incubaron células de bazo con la

Fig. 9. Mostramos  $5 \times 10^8$  CFU de cada cepa (NZSEC:p35-p40 ó NZSEC:scIL-12), que es la cantidad normalmente reportada para ensayos de inmunización usando *L. lactis*



**Fig. 9. Inducción *in vitro* de IFN- $\gamma$  en células de bazo de ratón por el *L. lactis* recombinante.** Se incubaron células de bazo de ratón con los lactococcos recombinantes o con muestras de sobrenadante de cultivos para dar aproximadamente la misma concentración que el control:  $1 \times 10^9$  para la cepa NZSEC:p35-p40 y  $5 \times 10^8$  para NZSEC:IL-12. La concentración de IFN- $\gamma$  fue de 60 pg/ml para el control (rIL-12), 30 y 28 pg/mL para las células de la cepa NZSEC:p35-p40 y su sobrenadante respectivamente y 33 pg/mL y 26 pg/mL para la cepa NZSEC:IL-12. Los valores están registrados como la media  $\pm$  SE de tres diferentes experimentos.





cepa *wt* de *L. lactis* o con PBS solo. Como se esperaba, en estas muestras no se detectó inducción de IFN- $\gamma$  (datos no mostrados).

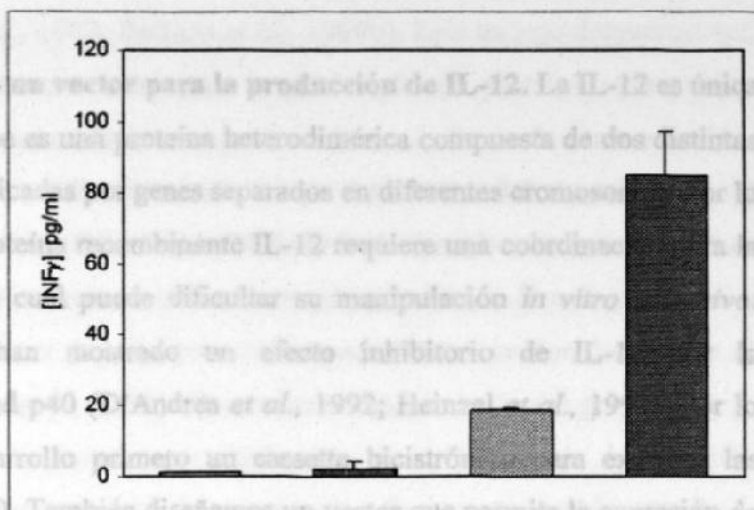
Estos resultados sugieren que la scIL-12 y la IL-12p70 tienen actividad específica similares ya que la inducción usando cantidades iguales de cada una resulta en cantidades iguales de IFN- $\gamma$ . Sin embargo hay que resaltar que la cantidad usada de la cepa NZSEC:p35-p40 para obtener los mismos efectos que la cepa NZSEC:scIL-12 fue dos veces mayor ( $1 \times 10^9$  CFU *versus*  $5 \times 10^8$  CFU). Esto puede representar un problema para propósitos de vacunación, ya que debería administrarse un gran número de células para obtener una buena respuesta.

**4.4.4 Administración intranasal con *L. lactis* recombinante induce la producción de IFN- $\gamma$  en células de bazo *in vivo*.** Se midió la actividad biológica de la proteína IL-12 producida por *L. lactis in vivo* después de la administración *in* de cultivos inducidos de las cepas recombinantes tal y como se describió en material y métodos.

Dado que el objetivo final de este trabajo es el de construir una cepa para uso en terapia, administramos  $5 \times 10^8$  CFU de cada cepa (NZSEC:p35-p40 ó NZSEC:scIL-12), que es la cantidad normalmente reportada para ensayos de inmunización usando *L. lactis* como vector (Steidler *et al.*, 1998; 2000). La respuesta proliferativa de células de bazo reestimuladas con PHA (un mitógeno de células T) fue mayor en aquellos animales que recibieron las cepas de *L. lactis* expresando la IL-12 (IL-12p70 y scIL-12), que aquellos que recibieron únicamente la cepa *wt* ó PBS solo (Fig. 10). De forma interesante las células de bazo de ratones tratados con la cepa NZSEC:scIL-12 (scIL-12) produjeron una mayor cantidad de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con PHA que las células de ratones tratados con la cepa NZSEC:p35-p40 (IL-12p70). Estos resultados muestran que  $5 \times 10^8$  CFU de la cepa NZSEC:scIL-12 inducen una mayor producción de IFN- $\gamma$  que la cepa NZSEC:p35-p40. Esta diferencia puede ser debido a la cantidad de IL-12 producida y observada en las muestras de cultivo de los lactococos recombinantes en los ensayos de inmunodetección y ELISA (Fig. 7b y 8). Las células de bazo de los ratones que recibieron la cepa *wt* produjeron muy bajas cantidades de IFN- $\gamma$ , y aquellos que recibieron PBS solo no presentaron evidencia de producción de IFN- $\gamma$  (datos no mostrados).

4.5 DISCUSION

-  PBS
-  *L. lactis* (wt)
-  NZSEC:p35-p40
-  NZSEC:scIL-12



**Fig. 10. Producción de IFN- $\gamma$  de células de bazo de ratones tratados con *L. lactis* recombinantes.** Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron analizados después de sacrificar a los ratones inmunizados con  $5 \times 10^8$  CFU de *L. lactis* recombinantes (día 35). Note que ambas cepas fueron administradas a la misma concentración. Los resultados muestran una mayor producción de IFN- $\gamma$  en los ratones que recibieron la cepa NZSEC:IL-12 que aquellos que recibieron la NZSEC:p35-p40. Los ratones que recibieron la cepa wt muestran un bajo incremento de IFN- $\gamma$  y los que fueron inmunizados con PBS no muestran evidencia en la inducción de IFN- $\gamma$ . Los valores fueron registrados como la media  $\pm$  SE de  $n$ =tres ratones/grupo tratado.

... las dos subunidades (p35 y p40). Se ha reportado que la subunidad p40 es capaz de formar homodímeros (p40)<sub>2</sub> (Ling et al., 1995). Este fenómeno puede explicar que la cantidad de IL-12 activa, sean menor cuando se co-expresan las subunidades p35 y p40 por separado. Ya que un exceso en la producción de p40 tiene efectos inhibitorios sobre los efectos biológicos del heterodímero IL-12 (IL-12p70) (Ling et al., 1995), es preferible el uso de la IL-12 de fusión (scIL-12) para aplicaciones *in vivo*.

A la fecha, la mayoría de los reportes en la producción de IL-12 han sido en células eucariotas (García & Chadea, 2001; Takahara et al., 2000; Kokuho et al., 1999; Gren et al., 1998). Recientemente Steidler et al. (2000) demostraron que *L. lactis* es capaz de producir y secretar en forma biológicamente activa la IL-10, una interleucina soluble. En contraste, en este trabajo, nosotros demostramos por primera vez que *L. lactis* es capaz de producir, secretar y ensamblar la IL-12, una proteína dimerica, que requiere la formación de puentes disulfuro para un apropiado ensamblaje. La formación de puentes disulfuro representa un cuello de botella en la producción de proteínas heterólogas



## 4.5 DISCUSION

**4.5.1 *Lactococcus lactis* como un vector para la producción de IL-12.** La IL-12 es única entre las interleucinas dado que es una proteína heterodimérica compuesta de dos distintas subunidades (p35 y p40) codificadas por genes separados en diferentes cromosomas. Por lo tanto la producción de una proteína recombinante IL-12 requiere una coordinación para la expresión de ambos genes lo cual puede dificultar su manipulación *in vitro* e *in vivo*. Además, estudios previos han mostrado un efecto inhibitorio de IL-12 por la sobreexpresión de la subunidad p40 (D'Andrea *et al.*, 1992; Heinzel *et al.*, 1994). Por lo tanto en este trabajo se desarrollo primero un cassette bicistrónico para expresar las subunidades p35 y p40 (Fig. 5). También diseñamos un vector que permite la expresión de una IL-12 de fusión (Fig. 5). Este cassette garantiza la estequiometría de la IL-12, ya que ambas subunidades (p35 y p40) se encuentran unidas covalentemente por un péptido sintético; además, presenta la ventaja de ser de fácil manipulación y la capacidad para co-expresar otro gene con dicha citocina. A pesar de que ambas construcciones tienen un diseño similar y que las inducciones fueron iguales, los datos obtenidos por ELISA muestran que los niveles de producción de la scIL-12 son de forma significativa mayores que los de las dos subunidades (p35 y p40). Se ha reportado que la subunidad p40 es capaz de formar homodímeros (p40<sub>2</sub>, Ling *et al.*, 1995). Este fenómeno puede explicar que la cantidades de IL-12 activa, sean menor cuando se co-expresan las subunidades p35 y p40 por separado. Ya que un exceso en la producción de p40 tiene efectos inhibitorios sobre los efectos biológicos del heterodímero IL-12 (IL-12p70, Ling *et al.*, 1995), es preferible el uso de la IL-12 de fusión (scIL-12) para aplicaciones *in vivo*.

A la fecha, la mayoría de los reportes en la producción de IL-12 han sido en sistemas eucariotes (Gaucher & Chadee, 2001; Takehara *et al.*, 2000; Kokuho *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 1998). Recientemente Steidler *et al.* (2000) demostraron que *L. lactis* es capaz de producir y secretar en forma biológicamente activa la IL-10, una interleucina monomérica. En contraste, en este trabajo, nosotros demostramos por primera vez que *L. lactis* es capaz de producir, secretar y ensamblar la IL-12, una proteína dimérica, que requiere la formación de puentes disulfuro para un apropiado ensamblaje. La formación de puentes disulfuro representa un cuello de botella en la producción de proteínas heterólogas

en sistemas procariotes, específicamente en organismos Gram positivos, ya que no poseen espacio periplásmico (Qiu *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999b). Este trabajo demuestra que *L. lactis* puede ser usado como un vector para la producción de proteínas que posean puentes disulfuro. Sería interesante analizar la producción en *L. lactis* de otras proteínas heterólogas que contengan puentes disulfuro, tales como el activador del plasminógeno, el cual contiene 17 puentes disulfuro (Qiu *et al.*, 1998). Estudios previos demuestran que es difícil la producción de este activador en una conformación correcta en *E. coli*, y que dicha producción puede optimizarse por la co-expresión de una cisteína oxidoreductasa en el periplasma de la bacteria (Qiu *et al.*, 1998). El creciente conocimiento del genoma de *L. lactis* (Bolotin *et al.*, 2001) y la posterior caracterización de la maquinaria de secreción podría en un futuro no muy lejano permitir la construcción de cepas recombinantes de *L. lactis* con capacidad para realizar modificaciones post-traduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro.

**4.5.2 *Lactococcus lactis* como vector de expresión de IL-12 para el desarrollo de una vacuna y para terapia antitumoral.** Dado que un gran número de vacunas son poco inmunogénicas, es de particular interés el uso de adyuvantes para el diseño de nuevas vacunas contra enfermedades infecciosas. La toxina del cólera (CT) y la enterotoxina de *E. coli* (LT) son dos potentes adyuvantes, sin embargo causan serias diarreas en humanos e inducen una respuesta Th2 que pueden pronunciar la patología más que erradicarla (Graham *et al.*, 1991, 1993). La IL-12 ha demostrado ser útil cuando es co-expresada con un antígeno en el desarrollo de vacunas (Boyaka & McGhee, 2001). La IL-12 previene el desarrollo de tolerancia a un antígeno dado (Chen *et al.*, 2001). Esta última característica es de gran interés para el desarrollo de vacunas vivas, ya que la persistencia del antígeno en la mucosa puede despertar una respuesta no deseada de tolerancia. La producción de la IL-12 por *L. lactis* ofrece diferentes ventajas: i) *L. lactis* no persiste en el organismo en modelos animales, y ii) la IL-12 aumenta la respuesta inmune hacia al antígeno de interés y previene la tolerancia. Estas características hacen a las cepas recombinantes de *L. lactis* descritas en este trabajo, de gran interés para usarse como adyuvantes en el desarrollo de vacunas vivas o para experimentos de inmunomodulación en estudios de alérgenos en los alimentos.

Steidler *et al.* (2000) mostraron que la IL-10 puede ser expresada de forma eficiente en ratones mediante la administración oral una cepa recombinante de *L. lactis*. La

concentración de interleucina necesaria para obtener una respuesta inmune se calculó: 10 veces menor que aquella administrada de forma sistemática. La administración local de citocinas por la bacteria grado alimenticio *L. lactis* parece por lo tanto ser más efectiva que la administración sistemática. Esto es de gran interés en nuestro caso, ya que la IL-12 administrada sistemáticamente ha presentado efectos negativos. Así, nuestras cepas recombinantes representan excelentes vectores para la expresión a nivel mucosas de la IL-12 en tratamientos donde es preferible la administración local que la sistemática.

La IL-12 posee también un potente efecto antitumoral y puede representar un atractivo agente en la inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, a pesar del éxito que ha tenido la IL-12 en la terapia contra el cáncer, modelos clínico experimentales (donde esta citocina es administrada de forma sistemática) han mostrado una alta toxicidad, relacionada a una elevada producción de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  tiene una variedad de efectos immunoregulatorios, entre los cuales se incluye la inducción de la diferenciación celular Th1 y activación de células NK (Boehm *et al.*, 1997). No obstante, aunque una respuesta inflamatoria mediada por citocinas, puede ser protectora, una producción elevada de estas citocinas (IFN- $\gamma$ , por ejemplo) puede resultar en un efecto tóxico (Cowdery *et al.*, 1996). Por esto y ya que la inducción de IFN- $\gamma$  por la IL-12 representa la más clara función biológica de esta citocina, en este trabajo se determinó si la IL-12 producida por *L. lactis* induce IFN- $\gamma$  con o sin efectos co-laterales. Los resultados obtenidos muestran que la administración *i.n.* de *L. lactis* que expresa la IL-12 induce la producción de bajos niveles de IFN- $\gamma$  sin aparente toxicidad. Además nuestra cepa recombinante de *L. lactis* carece de cualquier capacidad para multiplicarse *in vivo*, lo cual aunado al hecho de que el sistema de expresión de IL-12 es inducible (por la nisina), garantiza que la cantidad de citocina administrada es única y la respuesta inmune dependerá de la capacidad de *L. lactis* para expresar la proteína a través de su paso por las mucosas. Segundo, la ruta de administración *i.n.* puede despertar una respuesta de anticuerpos local en la entrada de la mayoría de los patógenos. Tercero, varios antígenos expresados en *L. lactis* son poco inmunogénicos (Lee *et al.*, 2001; L. Ribeiro *et al.*, comunicación personal, y nuestras observaciones). Por lo tanto el uso de las cepas recombinantes de *L. lactis* productoras de IL-12 co-expresando antígenos, podría ser de particular interés en el desarrollo de vacunas. Cuarto, *L. lactis*, al igual que otras BL grado alimenticio, tienen la ventaja de ser administradas fácilmente (*i.n.*

u oral), bajos costos de producción y preservación a largo tiempo, lo cual hace que este vector pueda ser fácilmente distribuido para su aplicación en todo el mundo (sobre todo en países en vías de desarrollo). Finalmente el mayor aporte de este trabajo es que las cepas aquí reportadas son capaces de producir y expresar a nivel mucosa después de una administración *i.n.* la IL-12. El uso de *L. lactis* expresando IL-12 en terapia puede representar una mejor alternativa que el uso de la terapia sistémica manteniendo bajos niveles de producción de IFN- $\gamma$ .

## 4.6 REFERENCIAS

- Arulanandam BP, O'Toole M, & Metzger DW. (1999). Intranasal interleukin-12 is a powerful adjuvant for protective mucosal immunity. *Journal of Infectious Diseases*. 180:940-994.
- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss S, Támez-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, & Le Loir Y. (2002). Expression of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:917-922.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, & Howard JC. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review in Immunology*. 15:749-795.
- Bolhuis A, Venema G, Quax WJ, Bron S, van Dijl JM. (1999a). Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 274:24531-24538.
- Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, & van Dijl JM. (1999b). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*. 65:2934-41.
- Bolotin A, Wincker P, Mauer S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, & Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*. 11:731-753.
- Boyaka PN, & McGhee JR. (2001). Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Advances Drug. Deliv. Rev.* 51:71-79.
- Brunda M, Luistro L, Warriar R, Wright R, Hubbard B, Murphy M, Wolf S, & Gately MK. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *Journal of Experimental Medicine*. 178:1223-1230.
- Chan SH, Perussia B, Grupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SG, Young D, Clark SC, & Trinchieri G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *Journal of Experimental Medicine*. 173:869-879.
- Chen B, Timiryasova TM, Gridley DS, Andres ML, Dutta-Roy R, & Fodor L (2001). Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated il-2 and il-12 antitumor immunotherapy. *Cytokine*. 15:305-134.

- Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, & Corthier G. (2001). Induction of Mucosal Immune Response after Intranasal or Oral Inoculation of Mice with *Lactococcus lactis* Producing Bovine Beta-Lactoglobulin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8:545-551.
- Chizzonite R, Traitt T, Podlaski FJ, Wolitzky AG, Quinn PM, Nunes P, Stern AS, & Gately MK. (1991). IL-12: monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. *Journal of Immunology*. 147:1548-1556.
- Chung YS, Breidt F, & Dubnau D. (1998). Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 29:905-913.
- Claessen AM, von Blomberg BM, De Groot J, Wolvers DA, Kraal G, & Scheper R. (1996). Reversal of mucosal tolerance by subcutaneous administration of interleukin-12 at the site of attempted sensitization. *Journal of Immunology*. 88:363-367.
- Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, & Krieg AM. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *Journal of Immunology*. 156:4570-4575.
- Cohen J. (1995). IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science*. 270:908.
- D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nick-barg E, Chizzonite R, Wolf SF, & Trinchieri G. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*. 176:1387.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, & Corthier G. (2001). Bovine Rotavirus Nonstructural Protein 4 Produced by *Lactococcus lactis* Is Antigenic and Immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1423-1428.
- Fleury Y, Dayem MA, Montagne JJ, Chaboisseau E, Le Caer JP, Nicolas P, & Delfour A. (1996). Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry*. 271:14421-14429.

- Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing *Journal of Bacteriology*. 154:1-9.
- Gaucher D, & Chadee K. (2001). Molecular cloning of gerbil interleukin 12 and its expression as a bioactive single-chain protein. *Cytokine*. 14:177-183.
- Gibson TJ. (1984). PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- Graham BS, Bunton LA, Wright PF, & Karzon DT. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 88:1026-1033.
- Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, & Colley DG. (1993). Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *Journal of Immunology*. 151:2032-2040.
- Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Mabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, & Gately MK. (1991). Coexpression of Two Distinct Genes is Required to Generate Secreted Bioactive Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 88:4143-4147.
- Heinzel FP, Rerko DM, Ling P, Hakimi J, & Schoenhaut DS. (1994). Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infection and Immunity*. 62:4244.
- Hessle C, Hanson LA, & Wold AE. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clinical and Experimental Immunology*. 116:276-282.
- Hessle C, Andersson B, & Wold AE. (2000). Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infection and Immunity*. 68:3581-3586.
- Hultgren OH, Stenson M, & Tarkowski A. (2001). Role of IL-12 in *Staphylococcus aureus*-triggered arthritis and sepsis. *Arthritis Research*. 3:41-47.
- Jacobson MA, Hardy D, Connick E, Watson J, & DeBruin M. (2000). Phase I trial of a single dose of recombinant human interleukin-12 in human immunodeficiency virus-infected patients with 100-500 CD4 cells/microl. *Journal of Infection Diseases*. 182:1070-1076.

- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chang S, Koudon R, Sherman F, Perussia B, & Trinchieri G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes *Journal of Experimental Medicine* 170:827-845.
- Kokuho T, Watanabe S, Yokomizo Y, & Inumaru S. (1999). Production of biologically active, heterodimeric porcine interleukin-12 using a monocistronic baculoviral expression system. *Veterinary and Immunological Immunopathology*. 72:289-302.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Langella P, & Le Loir Y. (1999). Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 32:191-198.
- Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, & Langella P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 180:1895-1903.
- Lee M H, Roussel Y, Wilks M, & Tabaqchali S. (2001). Expression of Helicobacter pylori urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against H. pylori infection in mice. *Vaccine*. 19:3927-3935.
- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Y-C, E. Pan, & Hakimi J. (1995). Human IL-12 p40 Homodimer Binds to the IL-12 Receptor but Does Not Mediate Biologic Activity. *Journal of Immunology*. 154:116-127.
- Lui VW, Falo LD, & Huang L. (2001). Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression in vivo. *Journal of Medical Genetics*. 3:384-393.
- Mazzolini G, Narvaiza I, Perez-Diez A, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Sangro B, Ruiz J, Prieto J, Melero L (2001). Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. *Gene Therapy*. 8:259-267.
- Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, & Julkunen I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 66:6058-6062.



- Nastala C, Edington H, McKinney T, Tahara H, Nalesnik M, Brunda M, Gately MK, Wolf S, Schreiber R, Storkus W, & Lotze M. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *Journal of Immunology*. 153:1697-1703.
- Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, & Okuda K. (1997). Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *Journal of Immunology*. 159:3638-3636.
- Paik SH, Chakicherla A, & Hansen JN. (1998). Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*. 273:23134-23142.
- Payne MS, & Jackson EN. (1991). Use of alkaline phosphatase fusions to study protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 173:2278-2282.
- Piard JC, Jimenez-Diaz R, Ehrlich SD, Fischetti VA, & Gruss A. (1997). The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. p.545-550.
- Poquet I, Ehrlich SD, & Gruss A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 7:1904-12.
- Qiu J, Swartz JR, & Georgiou G. (1998). Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4891-4896.
- Rakhmievich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM, Grota K, & Yang N-Y. (1996). Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established and metastatic murine tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 93:6291-6296.
- Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, & Langella P. (2002). Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen

- L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:910-916.
- Shen H, Li C, Liu M, Zhang Z, & Shen Q. (1998). Expression of human interleukin 12 (hIL-12) in insect cells. *Chinese Journal of Biotechnology*. 14:205-212.
- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity*. 66:3183-3189.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, & Remaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 289:1352-1355.
- Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, & Gubler U. (1992). Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology*. 148:3433-3440.
- Takehara K, Nagata T, Kikuma R, Takanashi T, Yoshiya S, Yamaga A, Yokomizo Y, & Nakamura M. (2000). Expression of a bioactive bovine interleukin-12 using baculovirus. *Veterinary and Immunological Immunopathology*. 77:15-25
- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, & Folkman J. (1995). Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *Journal of the National Cancer Institute*. 19:581-586.
- Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. (1997). Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J. Exp. Med.* 186:1119-1128.
- Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young E, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, Kelleher K, Herrmann SH, Clark SC, Azzoni L, Chan H, Trinchieri G, & Perussia B. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *Journal of Immunology*. 146:3047-3081.

## 5.1 Inducción de una respuesta inmune contra la proteína E7 del VPH-16 mediante su expresión en *Lactococcus lactis* y la de la IL-12 murina

### RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial. El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) es el principal agente etiológico del CaCu y algunas de las estrategias que se han desarrollado en los últimos años para combatirlo es el desarrollo de vacunas contra este virus. Desgraciadamente muchas de estas estrategias resultan poco confiables ó recomendables en pacientes inmunosuprimidos o en infantes debido a su patogenicidad. Como se menciona al principio de este trabajo el objetivo final de nuestro estudio es el inducir inmunidad específica contra la proteína E7 del VPH-16. Para esto se llevo a cabo la construcción de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la proteína E7 en diferentes localizaciones celulares (citoplasma y secretada) y bajo diferentes condiciones de crecimiento celular. Además se analizó el efecto estabilizador de una proteína de fusión Nuc-E7. Por otro lado con el propósito de incrementar la respuesta inmune contra E7 construimos una cepa de *L. lactis* capaz de secretar dos tipos de IL-12 murina (fuerte estimulador del sistema inmune) de forma biológicamente activa: IL-12 dimérica (subunidades p35 y p40, IL-12p70) y una IL-12 monomérica (ambas subunidades fusionadas, scIL-12). En esta parte final de nuestro estudio se analizó la capacidad de las diferentes cepas construidas para despertar una respuesta inmune específica de antígeno (E7). Los resultados obtenidos después de la administración intranasal en ratones muestran que la cepa más inmunogénica es aquella que expresa la proteína de fusión Nuc-E7 en forma secretada. Además cuando esta proteína es co-expresada con la scIL-12, aumenta de forma significativa la respuesta inmune. Estos resultados muestran el gran potencial de nuestro sistema como un modelo seguro de vacuna contra el VPH y otras neoplasias relacionadas.

## 5.2 INTRODUCCION

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial. En México es la principal causa de muerte por neoplasias en las mujeres de 25 años y más y en 1997 se registraron 4,534 defunciones. Esto significa que mueren en el país 1 mujer cada 2 horas a causa de esta enfermedad (Mohar *et al.*, 1997). En los últimos años se han encontrado fuertes evidencias de que el principal factor causante del CaCu es la infección por el virus del papiloma humano tipo-16 (VPH-16). Bishop *et al.* (1995) calcula que es muy probable que el número de casos de CaCu aumente significativamente en los próximos años, esto debido a que conforme aumenta la edad de la población y aumenta el número de mujeres infectadas por el VPH o se encuentran inmunosuprimidas por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), también aumentarían los casos de mujeres con CaCu. El VIH aumenta la susceptibilidad al CaCu y sus lesiones precancerosas.

Estudios previos han demostrado que el transcrito y proteína viral más abundante en lesiones cervicales asociadas al VPH-16 es la proteína E7, por lo que representa un potencial candidato para el desarrollo de una vacuna contra el CaCu asociado a la infección por el VPH.

Las tradicionales vacunas administradas de forma intramuscular o vía subcutánea (inyectables), están principalmente involucradas en la inducción de una respuesta inmune sistémica (anticuerpos en suero sanguíneo y células T). Mientras que estas vacunas pueden ser apropiadas para enfermedades causadas por agentes infecciosos que penetran al cuerpo por punción o daño en la piel (tétanos por ejemplo), es bien conocido que cerca del 90% de los patógenos infectan de manera natural al huésped por vía mucosa, ya sea oral, nasal o genital. Desgraciadamente las vacunas inyectables no son capaces de despertar inmunidad en mucosas. Por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevas vacunas que puedan ser administradas por vía mucosa, las cuales además de resultar más efectivas en la prevención o limitación de infecciones vía mucosa ofrecen varias ventajas sobre las inyectables: i) fácil administración, ii) reducción de efectos colaterales, iii) evita el uso de jeringas, iv) abre la posibilidad para ilimitadas inmunizaciones sin la necesidad de personal entrenado. Todas

estas ventajas pueden reducir considerablemente los costos y seguridad en las campañas de vacunación sobre todo en los países en vías de desarrollo.

A pesar de las importantes ventajas de la inmunización a través de la mucosa, el éxito de esta ha sido muy limitado debido a la degradación de los antígenos usados, limitada adsorción e interacción con factores en la mucosa del huésped no específicos, y el uso de sistemas de expresión inadecuados. Recientes investigaciones han resultado en el desarrollo de prometedoras vacunas basadas en sistemas de expresión de antígenos por vía mucosa. Dichos sistemas incluyen patógenos atenuados expresando algún antígeno de interés médico y micropartículas inertes sintetizadas químicamente y precargadas con el antígeno de interés. El uso de bacterias o virus atenuados tienen la desventaja que son organismos que han sido modificados para convertirlos en sistemas no patogénicos, y que improbablemente garantizan la seguridad del sistema, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las micropartículas inertes (polímeros biodegradables por ejemplo) son precargadas con la proteína de interés durante el proceso de elaboración, por ende el antígeno debe ser previamente aislado y purificado antes de la formación de la micropartícula, lo cual es muy laborioso y costoso. Sistemas de expresión no patogénicos, como las bacterias lácticas (BL) pueden representar una alternativa segura y de bajo costo. Las BL son un grupo de microorganismos bien conocido debido a que sus fermentaciones constituyen una de las formas más antiguas de conservación de productos de la industria alimenticia (yogurt, quesos, mantequilla, crema, etc) y de la agricultura (sidra, vino, cerveza, etc). La BL mejor estudiada y caracterizada a la fecha es sin duda *Lactococcus lactis*, una bacteria gram-positiva no patógena y no colonizante que ha sido ampliamente manipulada para expresar proteínas heterólogas (Dieye *et al.*, 2001; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2002). Dado que *L. lactis* no coloniza las mucosas, es necesario cargar a la bacteria con el antígeno de interés antes de la inmunización mediante un sistema de expresión génica inducible. En este aspecto *L. lactis* actuaría similar a las micropartículas inertes, la diferencia es que aquí no hay necesidad de aislamiento y purificación del antígeno, ya que este sería producido por la bacteria. Como todos los sistemas no replicativos, la inmunización con *L. lactis* requiere de el uso de adyuvantes para inducir una buena respuesta inmune. La Interleucina-12 (IL-12) es una molécula estimuladora del sistema inmunitario (adyuvante) que ha demostrado prometedores

resultados en la terapia génica contra el cáncer. En este contexto el objetivo de este trabajo es el de inducir una respuesta inmune contra la proteína E7 del VPH-16 mediante su expresión en la bacteria no patógena y comestible *L. lactis*. Dado que la inmunogenicidad de una proteína expresada en una bacteria puede depender de su localización, así como de su conformación se analizaron las diferentes cepas construidas en el capítulo 2 y 3 las cuales incluyen cepas expresando la E7 en citoplasma, secretada al medio de cultivo y fusionada a una proteína resistente y compacta, la Nuc. Además para aumentar la respuesta inmune específica de antígeno se construyó una cepa capaz de secretar de forma biológicamente activa la IL-12 (capítulo 4). La expresión de todas las construcciones se llevo a cabo bajo el control del sistema inducible NICE (Expresión Controlada por Nisina, de Ruyter *et al.*, 1996, Kuipers *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos muestran que *L. lactis* es capaz de inducir una respuesta inmune específica de antígeno (E7) y que la co-expresión de dicho antígeno con un fuerte adyuvante como lo es la IL-12, mejora la respuesta inmune. En resumen este trabajo abre las puertas a una nueva línea de desarrollo de vacunas seguras y de bajos costos usando bacterias comestibles y no patógenas.

### 5.3 MATERIAL Y METODOS

**5.3.1 Cepas y métodos usados.** Las cepas utilizados en este trabajo fueron: NZCYT:E7, NZSEC:E7, NZCYT:Nuc-E7, NZSEC:Nuc-E7, NZSEC:scIL-12 (capítulo 2, 3 y 4) y NZ9000 de *L. lactis* (de Ruyter *et al.*, 1997).

**5.3.2 Preparación de células para ensayos *in vitro* y/o inmunizaciones.** Se cultivaron las diferentes cepas recombinantes en 20 ml de GM17 hasta una  $DO_{600}=0.5$ , se adicionó nisina (SIGMA) a una concentración de 10 ng/mL y se dejó incubar hasta una  $DO_{600}=1$ . Se centrifugó para recuperar la pastilla, y se hicieron 3 lavados con PBS. Finalmente las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS.

**5.3.3 Inmunización.** Grupos de 5 ratones C57BL/6J hembras (5-8 semanas de edad) fueron parcialmente anestesiados con Xilacina vía intramuscular. Se tomaron 20  $\mu$ L de las bacterias recombinantes de *L. lactis* ( $5 \times 10^8$  colonias formadoras de unidad, CFU) y se aplicaron por vía *i.n.* a los días 1, 14 y 28. Como control se inmunizaron ratones con una cepa silvestre de *L. lactis* (*wt*, NZ9000).

**5.3.4 Obtención de células de bazo.** Siete días después de la última inmunización (día 35) los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de total esterilidad se obtuvo el bazo, se le agregó 1 mL de medio de cultivo AIM-V (GIBCO) y se maceró perfectamente. Posteriormente las células fueron transferidas cuidadosamente a un tubo estéril de 15 mL con 1 mL de HISTOPAQUE (SIGMA), y se centrifugó a 2500 rpm, 25 min. para separar las células mononucleares mediante un gradiente de densidad. Se recuperó la fase blanca (células mononucleares) y se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL y se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ L de medio AIM-V. Finalmente se resuspendieron en 500  $\mu$ L del mismo medio y se hizo un conteo de las células con azul tripano (SIGMA).

**5.3.5 Inducción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en células de bazo por las cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*.** Se analizó la capacidad de diferentes cepas recombinantes de *L. lactis* para inducir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, después de una administración *i.n.* Para esto, se cultivaron  $2 \times 10^6$  células de bazo en cajas de 24 pozos (2 mL por pozo), agregando a cada pozo 50  $\mu$ L de PBS estéril ó 2  $\mu$ g de un péptido sintético de E7 (RAHYNIVTF, resuspendido en 50  $\mu$ L de PBS). El volumen se llevó a 2 mL con medio AIM-V y se incubó 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 24 hrs se tomó 1.5 mL del cultivo y se

centrifugó a 5000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. La detección de INF- $\gamma$  e IL-2 se realizó mediante ELISA (R&D System).

**5.3.6 Estadísticas.** Los resultados obtenidos de los ensayos de ELISA son expresados como la media  $\pm$  una desviación estándar.



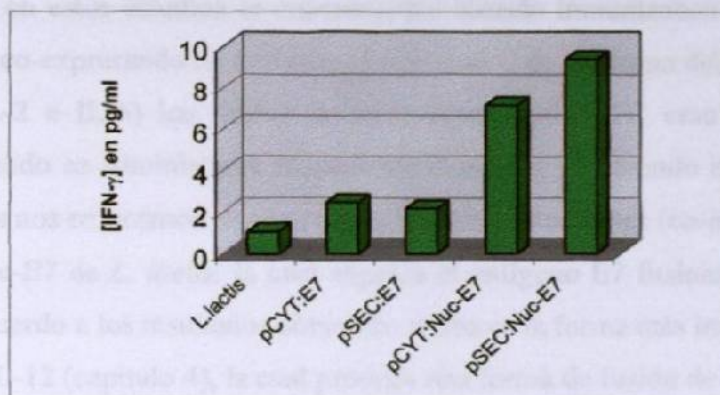
## 5.4 RESULTADOS

**5.4.1 La proteína híbrida Nuc-E7 en forma de secreción es más inmunogénica que una E7 nativa.** Para determinar cual de las cepas de *Lactococcus lactis* expresando la oncoproteína E7 del VPH-16 en diferentes localizaciones celulares y fusionada a una proteína compacta y altamente estable, la nucleasa Staphylococcal (Nuc), analizamos el efecto de la administración local (intranasal, *i.n.*) de los diferentes lactococos recombinantes construidos a lo largo de todo este estudio. Para esto, se inmunizaron a diferentes tiempos, grupos de 5 ratones con las cepas de *L. lactis* expresando E7 (ver material y métodos) y se sacrificaron para detectar la producción de citocinas relacionada con la respuesta inmune celular: IFN- $\gamma$  e IL-2. El IFN- $\gamma$  es una potente citocina producida principalmente por linfocitos T (LT) activados por mitógenos y NK y la IL-2 es una citocina pleiotrópica producida por LT activados por mitógenos y por antígenos. Además, elegimos determinar los niveles de estas dos citocinas, ya que como se mencionó en el capítulo 1 (pag. 18), estudios en pacientes con CaCu presentan una disminución en la producción de citocinas Th1 (i.e., IFN- $\gamma$  e IL-2).

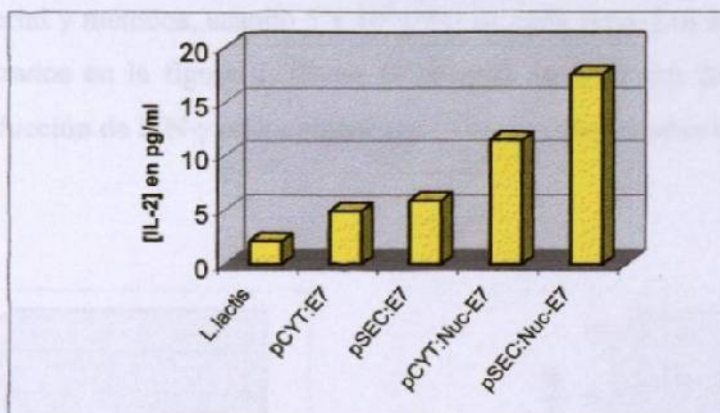
Los resultados obtenidos del análisis de citocinas de dichas inmunizaciones son mostrados en la figura 1. De forma sorprendente los resultados revelan una inducción significativamente mayor en la producción de INF- $\gamma$ , en aquellos ratones que fueron inmunizados con las cepas de *L. lactis* expresando la oncoproteína E7 fusionada a la Nuc, que aquellos inmunizados con la E7 nativa (Fig. 1a). Estos resultados pueden ser debido a dos causas: (1) la cantidad de antígeno producido en la forma de fusión es mayor que la forma nativa (~15 mg/mL *versus* ~5 mg/mL, capítulo 2) ó (2) la proteína Nuc puede coadyuvar con el antígeno E7 y despertar una mayor respuesta inmune. De las dos formas de proteínas Nuc-E7: expresada en citoplasma y secretada al medio de cultivo, esta última fue la más inmunogénica (Fig. 1a). Además, se llevaron a cabo ensayos con ratones inmunizados solo con PBS solo, en los cuales no se detecto inducción de estas citocinas o la producción de éstas fue parecida a la del control (*L. lactis*, datos no mostrados).

Análisis de inducción de IL-2 en ratones inmunizados con los lactococos recombinantes muestran el mismo patrón que el observado para la producción de IFN- $\gamma$

(a)



(b)



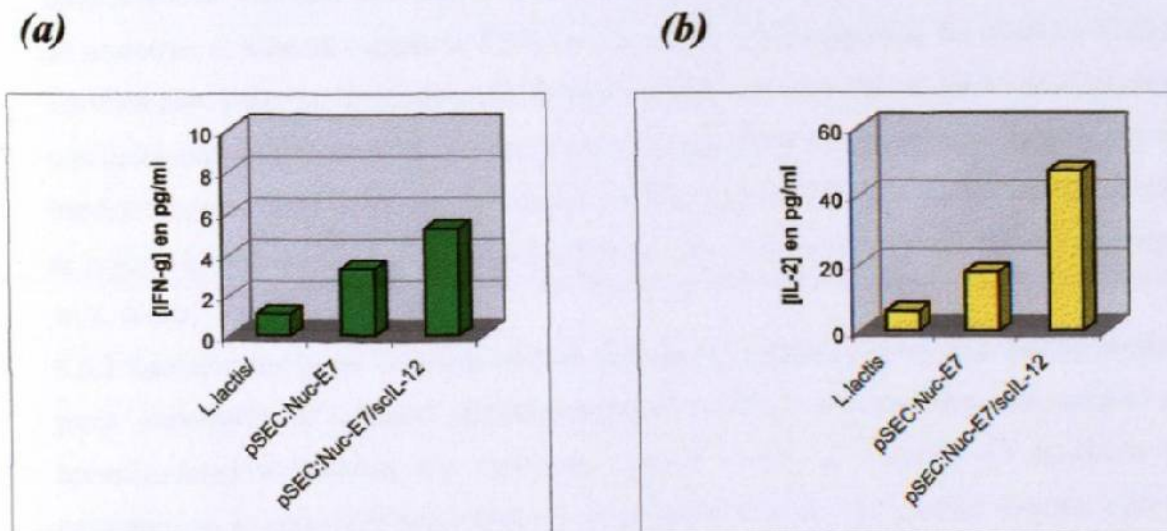
**Fig. 1. Inducción de IFN- $\gamma$  e IL-2 por *Lactococcus lactis* expresando E7 en diferentes localizaciones celulares y fusionada a Nuc.** Células de bazo de ratones inmunizados con la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) y con las diferentes cepas recombinantes expresando la E7 nativa en citoplasma (NZCYT:E7) ó secretada (NZSEC:E7) y la proteína híbrida Nuc-E7 en citoplasma (NZCYT:Nuc-E7) ó secretada (NZSEC:Nuc-E7), se estimularon *in vitro* con un péptido sintético de E7 (RAHYNIVTF) y se detectaron citocinas implicadas en la respuesta inmune celular: IFN- $\gamma$  (a) e IL-2 (b).

(Fig. 1b), confirmando que la proteína de secreción Nuc-E7 producida por la cepa NZSEC:Nuc-E7 al medio de cultivo representa el mejor candidato para despertar una respuesta inmune contra el antígeno E7 del VPH-16.

**5.4.2 La co-administración de *L. lactis* expresando la proteína Nuc-E7 y la scIL-12 aumenta considerablemente la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2.** En trabajos previos Steidler

et al. (1998) demostraron que *L. lactis* es capaz de expresar citocinas biológicamente activas. Además en estos estudios se encontró que cuando inmunizaban ratones con una cepa de *L. lactis* co-expresando un antígeno (fragmento C de la toxina del cólera, TTFC) y una citocina (IL-2 e IL-6) los títulos de anticuerpos anti-TTFC eran sustancialmente mayores que cuando se administraba únicamente una cepa expresando el TTFC. En este contexto nosotros nos enfocamos en administrar de forma simultánea (co-administración) la cepa NZSEC:Nuc-E7 de *L. lactis*, la cual expresa el antígeno E7 fusionado a la proteína Nuc, y que de acuerdo a los resultados obtenidos arriba es la forma más inmunogénica y, la cepa NZSEC:scIL-12 (capítulo 4), la cual produce una forma de fusión de la citocina IL-12 (scIL-12), una potente molécula estimuladora del sistema inmune.

Los ensayos de inmunización y análisis de citocinas se hicieron tal y como se describió en material y métodos, usando  $5 \times 10^8$  CFU de cada cepa. Los resultados de este ensayo son mostrados en la figura 2. Como se observa en la figura 2a existe un claro aumento en la inducción de IFN- $\gamma$  en los ratones que fueron inmunizados con las dos cepas



**Fig. 2. Inducción de INF- $\gamma$  e IL-2 por *Lactococcus lactis* co-expresando Nuc-E7 e IL-12.** Células de bazo de ratones inmunizados con la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), con la cepa recombinante expresando Nuc-E7 (NZSEC:Nuc-E7) y con las cepas NZSEC:Nuc-E7 y la cepa secretando la scIL-12 (NZSEC:scIL-12) de forma simultánea, se estimularon *in vitro* con un péptido sintético de E7 (RAHYNIVTF) y se detectaron citocinas implicadas en la respuesta inmune celular: IFN- $\gamma$  (a) e IL-2 (b).

de *L. lactis* expresando Nuc-E7 e IL-12 en comparación de aquellos ratones que solo recibieron la cepa productora de Nuc-E7. Estos mismos resultados se repitieron en la medición de la IL-2 (Fig. 2b).

Estos resultados demuestran claramente que la IL-12 producida por *L. lactis* ejerce un significativo efecto adyuvante cuando ex co-administrado con un antígeno tumoral (E7).

## 5.5 DISCUSION

**5.5.1 *Lactococcus lactis* como un vector para presentar antígenos y citocinas a través de superficies de mucosa al sistema inmune.** La expresión de proteína heterólogas en *L. lactis* parece ser una buena vía de producción de proteínas de interés terapéutico, ya que de acuerdo a nuestros resultados tanto el antígeno E7 nativo, como uno fusionado a una proteína altamente estable, Nuc-E7, expresados por *L. lactis* son capaces de inducir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2. Estas citocinas, producidas por subpoblaciones de LT, son importantes moduladores de la respuesta inmune, induciendo la producción de otras citocinas que activan la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH) clase I y II y promoviendo la expansión clonal de LT específicos de antígeno entre muchos otros de sus efectos pleiotrópicos. El hecho de encontrar en este trabajo la inducción de IFN- $\gamma$  e IL-2 específica de antígeno en células de bazo de ratones nos indica que la proteína E7 esta siendo producida en una forma inmunogénica. Estudios previos (Wells *et al.*, 1995) han demostrado que *L. lactis* es capaz de presentar al sistema inmune la TTFC en una forma inmunogénica. No obstante dichos estudios solo reportan la producción de anticuerpos. Por otro lado el hecho de encontrar una inducción de citocinas en las células de bazo superficie y administrado *i.n.* es capaz de inducir una respuesta sistémica. A la fecha y a nuestro conocimiento es la primera vez que se reporta la inducción de una respuesta inmune celular (o al menos relacionada con esta) en *L. lactis*.

**5.5.2 *Lactococcus lactis* como un vector vivo para el desarrollo de una nueva vacuna para combatir el cáncer cérvico-uterino (CaCu).** Previamente un grupo de investigadores obtuvieron una respuesta inmune contra la proteína E7 mediante su expresión en la superficie de *Streptococcus gordonii* (Pozzi *et al.*, 1992); sin embargo en este trabajo tal respuesta se obtuvo en combinación con el adyuvante de Freund completo. En este trabajo nosotros obtuvimos una respuesta inmune específica de antígeno con la sola administración de *L. lactis* expresando E7. Además *S. gordonii* es un organismo comensal (microorganismo persistente que puede inducir inmunotolerancia) y GRAS pero no grado alimenticio. En contraste *L. lactis* es una bacteria totalmente inocua y no persistente que puede servir para el desarrollo de vacunas vivas, sin el riesgo de

colonización y por tanto disminuir las probabilidades de inducir inmunotolerancia. Además, *L. lactis* es un buen candidato para propósitos de vacunación ya que su ruta de administración (intranasal, oral o vaginal) lo hace de fácil administración y de bajo costo de producción. En resumen este trabajo demuestra el potencial de una BL grado alimenticio, no patogénica y no invasiva, para ser considerada como un vector para el desarrollo de una nueva vacuna viva para combatir enfermedades infecciosas, el CaCu en particular.

## 5.6 REFERENCIAS

- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss S, Támez-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, & Le Loir Y. (2002). Expression of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:917-922.
- Bishop A, Wells E, Sherris J, Tsu V, & Crook B. (1995). Cervical cancer: evolving prevention strategies for developing countries. *Reproductive Health Matters*. 6:60-71.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, & Piard JC. (2001). Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 183:4157-4166.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezen M, & de Vos WM. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64:15-21.
- Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, & de la Garza J. (1997). Descriptive epidemiology of cancer at the Instituto Nacional de Cancerología of México. *Salud Pública, México*. 39:253-258.
- Miyoshi, A, Poquet I, Azevedo V, Commissaire J, Le Loir Y, Bermúdez-Humarán LG, Oliveira S, Domakova E, Gruss A, & Langella P. (2002). Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. (En impresión).
- Pozzi G, Contorni M, Oggioni MR, Manganelli R, Tommasino M, Cavalieri F, & Fischetti VA. (1992). Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity*. 60:1902-1907.
- de Ruyter PG, Kuipers OP, & de Vos WM. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3662-3667.
- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, & Wells JM. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity*. 66:3183-3189.
- Wells JM, Norton PM, & Le Page RWF. (1995). Progress in the Development of Mucosal Vaccines Based on *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy Journal*. 5:1071-1079.

## CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra la capacidad de *Lactococcus lactis*, una bacteria Gram positiva, para producir la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16). Además, se analizaron diferentes localizaciones celulares para la expresión de dicha proteína, encontrando que la secreción al medio de cultivo representa la mejor vía para su producción, ya que en citoplasma la proteína E7 sufre proteólisis dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Esto es de gran interés ya que aún y cuando se analizó la producción de la E7 en cepas de *L. lactis* mutantes para las principales proteasas y chaperonas identificadas a la fecha, no fue posible rescatarla de la degradación. Esto sugiere que existe una nueva proteasa intracelular no identificada en *L. lactis* y que es activada en fase estacionaria del cultivo celular, y, que la proteína E7 representa un buen modelo para monitorear e identificar dicha proteasa.

Paralelo a la producción de E7 en cepas silvestres y mutantes de *L. lactis*, se analizó la capacidad de protección de una proteína altamente estable y compacta, la nucleasa Staphylococal (Nuc), fusionada a ambos extremos de la proteína E7. Los resultados muestran que dicha fusión resulta verdaderamente en un rescate de la proteína E7 en el citoplasma de *L. lactis*, además de que mejora el nivel de producción. Estos resultados muestran que la fusión de Nuc a E7 por sus dos extremos es capaz de rescatar a dicha proteína de degradación, en contraste a los resultados obtenidos con una fusión Myc y en un sistema eucariote, en el cual solo se rescata a la proteína E7 cuando es protegida por su extremo amino (N-). Por lo tanto la proteína Nuc puede servir para producir proteínas extremadamente frágiles en *L. lactis*.

En este trabajo se reporta también por primera vez, la producción de una citocina heterodimérica, la Interleucina-12 (IL-12), en una forma biológicamente activa. Esto es de gran trascendencia ya que dicha proteína esta compuesta por dos subunidades (p35 y p40) unidas por puentes disulfuro, lo cual revela que *L. lactis* es capaz de catalizar la formación de puentes disulfuro en proteínas heterólogas, característica



poco documentada en bacterias Gram positivas. Además, se logró la expresión de una proteína IL-12 de fusión (scIL-12) con funciones biológicas similares e incluso mayores a las de la IL-12 expresada mediante sus dos subunidades (IL-12p70). Este proteína garantiza una expresión equilibrada de ambas subunidades y facilita su manipulación *in vitro*.

Finalmente este estudio demuestra el gran potencial de *L. lactis*, para despertar una respuesta inmune específica del antígeno E7 del VPH-16 vía mucosa. *Lactococcus lactis*, es una bacteria no patógena y no colonizante considerada como un organismo grado alimenticio. Estas características facilitan la aceptación de este microorganismo para su uso en humanos, además de que su vía de inoculación (oral o nasal) y su capacidad para almacenarse por largos periodos de tiempo (sin la necesidad de refrigeración), permite que pueda ser fácilmente administrado y sin personal entrenado, lo cual es recomendable para su distribución y uso en países en vías de desarrollo. En resumen este trabajo representa un gran paso en el desarrollo de nuevas vacunas vivas y seguras para tratar el cáncer cérvico (CaCu) y combatir así, una de las neoplasias más frecuentes y malignas en la mujer mexicana.



